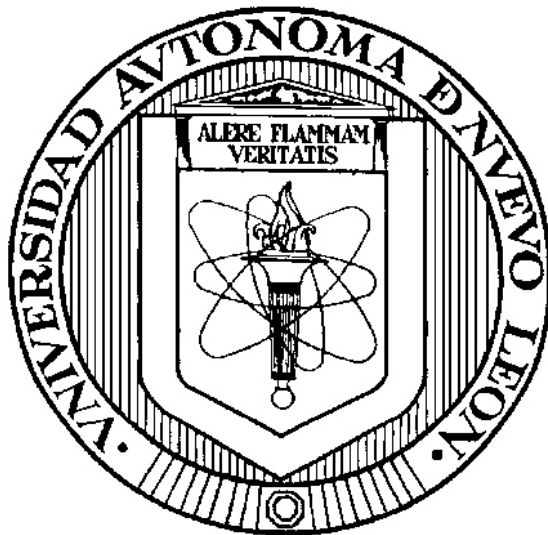


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN TÓPICA DE RIOLOZATRIONA Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD *in vivo* CONTRA VHS-1**

**POR**

**Q.C.B. JUAN FRANCISCO TAMEZ FERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
QUÍMICA BIOMÉDICA**

**JULIO, 2017**

**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN TÓPICA DE RIOLOZATRIONA Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD *in vivo* CONTRA VHS-1.**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo**

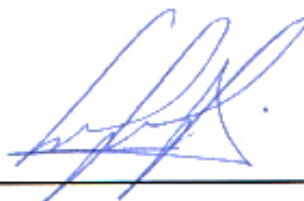
**Directora de Tesis**



---

**Dr. C. Ernesto Torres López**

**Co-Director de Tesis**



---

**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

**Miembro de la comisión**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN TÓPICA DE RIOLOZATRIONA Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD *in vivo* CONTRA VHS-1.**

*"A mis padres, a mis hermanos y a mi bella sobrina Lucía"*  
**Presentado por:**

**Q.C.B. JUAN FRANCISCO TAMEZ FERNÁNDEZ**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica y el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo, la Co-Dirección del Dr. Ernesto Torres López y como Miembro de la comisión la Dra. Rocío Álvarez Román.

**Directora**



**Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo**

**Co-Director**



**Dr. C. Ernesto Torres López**

**Miembro de la comisión**



**Dra. C. Rocío Álvarez Román**

## DEDICATORIA

***“A mis padres, a mis hermanos y a mi bella sobrina Leah”***

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a **Dios** por permitirme llegar hasta aquí y cumplir una meta más en mi vida, por bendecirme tanto como lo ha hecho hasta el día de hoy.

A **mis padres** quienes me dieron la vida, me han cuidado y dado lo mejor, gracias por todo y por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado y que sigo tomando, por darme la fuerza para siempre seguir adelante, ustedes son mí motor y siempre lo serán, los amo.

A mis hermanos, **Lily y Luis** por apoyarme siempre en mis locuras, en mis decisiones, por siempre estar al pendiente de mí y por darme el privilegio de ser tío de una hermosa princesa que esperamos con mucho amor, los amo a los tres. A mi pequeño hermano, él bebe de la casa, **Armandito**, por dejarme ser tu guía y tu hermano mayor, por siempre estar ahí para mí apoyándome y queriéndome tanto, te amo hermano mío.

A **toda mi familia**, por amarme, apoyarme en cada paso que doy, por siempre darme ánimos y hacerme sentir mejor en todo momento, tíos, primos, sobrinos, podría hacer una lista con todos sus nombres, pero no acabaría, la cuestión es que ustedes saben quiénes son y saben que los amo.

A **mis abuelos**, quienes ya no están con nosotros físicamente, pero sí en nuestros corazones, gracias por enseñarme a ser una persona trabajadora, responsable, pero sobre todo humilde, los amo y les agradezco todos esos bellos momentos que pasamos juntos.

A **mis amigos** gracias por llenar mi vida de felicidad con su presencia, por apoyarme en cada idea loca que se me ocurría, cada travesura, por hacer de este viaje más ligero y menos estresante, son una parte muy importante en mi vida, y más que mis amigos los considero mis hermanos, los quiero. Los voy a nombrar, no en orden de importancia ya que todos son importantes y tienen un lugar especial en mi corazón: **Erika Leal, Liliana, Idalia, Dámaris, Jorge, Roberto, Arisay, Gaby, Adriana, Adrián, Marco, Gualberto, Churro, Serely, Martha, Denisse, Víctor**. A mis manos: **Pam, Marlén, Anahí**, y la pequeña **Grettel**. A mi compañera de aventuras, la que me saca a bailar para que se me olviden los problemas y desestresarme, la que me sigue en todo y nunca me dice que no, a mi amiga **Sara**. A mis amigos del cubículo, mis compañeros de comida, quienes me ayudaron en todo momento, quienes me hacían reír siempre con cada cosa “curiosa” que sacaban y hacían que olvidara todo por un momento, **Omar y Cecy**.

A **mis amigos foráneos**, ustedes que se han convertido en mi familia de Monterrey, gracias por ser tan buenos conmigo, por aguantarme (vaya que es difícil, porque a veces ni yo me aguanto solo), por hacer que cada día sea mejor, por consentirme con sus ricas comidas, pero sobre todo por su amistad y su cariño, sin duda los voy a extrañar demasiado, estos dos años vivimos muchas experiencias juntos, todas ellas muy diferentes, algunas tristes otras muy divertidas, pero cada una ha valido la pena. Son muy importantes en mi vida, y aunque llegué “sólo” a su grupo jajaja agradezco a Dios por ponerlos en mi camino, quiero decirles que siempre van a poder contar conmigo para lo que sea, los quiero mucho **Aidé, Florencia, Montserrat, Ana Itzel “Mulan”, Frecia, Alejandro, Stephen, Iris, Enrique y bebecito Isaac**.

A la **Dra. Vero Rivas**, mi mentora, gracias por siempre apoyarme, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por depositar toda su confianza en mí para desarrollar tan bonito proyecto, me siento muy contento y muy orgulloso de formar parte de su equipo de trabajo y de ser su alumno, agradezco a Dios por ponerla en mi camino, mejor jefa no pude pedir, mil gracias por todo, espero haber cumplido con sus expectativas y haber desarrollado una buena labor, la quiero mucho.

A los **miembros de mi comisión**, el **Dr. Ernesto Torres**, muchas gracias por todo el aprendizaje y todo el conocimiento que me ha transmitido, por hacer que cada día de trabajo fuera divertido, por sus consejos y su apoyo, lo aprecio mucho y muchas gracias por la confianza que deposito en mí. A la **Dra. Rocío Álvarez** muchas gracias por todo el apoyo que me brindo en todo momento, por siempre estar al pendiente de mí y transmitirme su conocimiento, gracias por darme calma siempre que entraba en pánico cuando algo no salía bien, la quiero mucho. Al **Dr. David Silva** gracias por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis, por aguantarme cada vez que iba a pedirte algo, sabes que en mí siempre encontraras un amigo. Me siento muy feliz de haber tenido en mi comisión a personas tan buenas en todos los aspectos, mis expectativas no solo fueron cumplidas, si no que fueron sobrepasadas, gracias por todo.

A mis hermanas Riolo, **Elda y Yolanda**, sin ustedes el trabajo en el laboratorio no hubiera sido igual, gracias por hacer cada día en el laboratorio un día extraordinario lleno de risas por todas partes, con juegos, tonterías, en fin, por hacer que el trabajo no fuera pesado, sino divertido, pero sobre todo gracias por ser mis amigas, por ayudarme en todo y por aguantarme. Las quiero un montón.

A **Ivonne** por ser tan buena conmigo siempre, por ayudarme en cada cosa que se me dificultaba, por rescatarme de cada metida de pata que daba en el laboratorio, mil gracias bombón, sabes que te quiero mucho y siempre contaras conmigo.

A mis profesores de los cuales he aprendido mucho y me han apoyado a lo largo de mis estudios, quienes están siempre al pendiente, realmente los admiro demasiado y son un gran ejemplo a seguir, los aprecio mucho. **Dra. Ma de la Luz Salazar, Dra. Rocío Castro, Dr. Ricardo Lucio, Dr. Alejandro Pérez, Dra. Graciela Granados, M.C. Magda Escobar, Dra. Rosalba Rmz, Dr. Ricardo Salazar.**

A la **Dra. Noemí Waksman** por brindarme un gran apoyo desde la carrera hasta el posgrado, por recibirme en el Departamento de Química Analítica y permitirme realizar mis estudios de posgrado en este excelente departamento.

A **CONACYT** por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios.

En fin, gracias a todos aquellos que formaron parte de esta etapa, a quienes me apoyaron y creyeron en mí.

A los ratones que fueron empleados y que dieron la vida para poder desarrollar este trabajo.

***“El hombre que mueve montañas  
comienza cargando pequeñas piedras”***

**-Confucio (551-479 a. C.)**

**Filósofo chino**

***“El experimentador que no sabe lo que está buscando  
no comprenderá lo que encuentra”***

**-Claude Bernard (1813-1878)**

**Fisiólogo Francés**

## RESUMEN

Q.C.B. Juan Francisco Tamez Fernández

Fecha de graduación: Julio, 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

**Título de estudio:** DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN TÓPICA DE RIOLOZATRIONA Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD *in vivo* CONTRA VHS-1.

Número de páginas: 109

Candidato para el grado de Maestro en  
Ciencias con orientación en Química  
Biomédica

Área de estudio: Química Analítica.

### Propósito y método del estudio:

La queratoconjuntivitis herpética una de las manifestaciones clínicas de la infección ocular por VHS-1. Dentro de los tratamientos de esta infección se encuentran los análogos de nucleósido aciclovir, valaciclovir y famciclovir, este tratamiento puede reducir la intensidad y frecuencia de los síntomas, sin embargo, no curan la infección activa. Existen nuevos reportes de aislados clínicos con resistencia a estos antivirales por lo que es importante la búsqueda de nuevos tratamientos para esta infección como lo son los productos naturales. La Rioloatriona es un producto natural aislado a partir de *Jatropha dioica* con demostrada actividad anti-herpética moderada *in vitro*. En el presente trabajo se desarrollaron dos formulaciones tópicas de Rioloatriona, una solución y un ungüento oftálmico, a una concentración de 0.2% (p/v) y 0.3% (p/p), respectivamente, las cuales se caracterizaron fisicoquímicamente, por inspección física macroscópica y mediante análisis por CCF y <sup>1</sup>H-RMN. Por último, se determinó la estabilidad durante 3 meses. Ambas formulaciones fueron probadas en un modelo murino de queratoconjuntivitis herpética para evaluar su actividad anti-herpética *in vivo*. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de ANOVA de un factor seguido de una comparación múltiple de Tukey, donde el Aciclovir (2.5% p/v), el blanco de solución y el ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) presentaron diferencia significativa con una  $p < 0.05$  comparado con el control positivo de infección, demostrando así la actividad anti-herpética *in vivo*.

### Conclusiones y contribuciones:

Se lograron desarrollar dos formulaciones tópicas a base de Rioloatriona caracterizadas fisicoquímicamente; el ungüento oftálmico de Rioloatriona (0.3% p/p) fue quien mostró las mejores características, presentó estabilidad por al menos 3 meses y presentó actividad anti-herpética *in vivo*, además se observó un comportamiento similar al Aciclovir al 2.5 % (p/v) en la resolución de la queratoconjuntivitis herpética.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dra. C. Verónica Mayela Rivas Galindo



## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1.Virus del Herpes Simplex	1
1.1.1. Transmisión	2
1.1.2. Replicación viral	3
1.1.3. Patogénesis	4
1.1.4. Manifestaciones clínicas	5
1.1.5. Epidemiología	9
1.1.6. Diagnóstico	10
1.1.7. Tratamiento	11
1.2.Productos naturales con actividad antiviral	13
1.3. <i>Jatropha dioica</i>	15
1.4.Riolozatriona	16
1.5.Formulaciones farmacéuticas	17
1.6.Modelos experimentales para el estudio de la actividad antiviral	21
1.7.Justificación	25
1.8.Objetivo general	26
1.9.Objetivos específicos	26
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	27
2.1.Material, reactivos y equipo	27
2.1.1. Material Biológico	27

2.1.2. Material de laboratorio	27
2.1.3. Disolventes	29
2.1.4. Reactivos	30
2.1.5. Equipos	30
2.2. Métodos	31
2.2.1. Colecta de planta	31
2.2.2. Obtención de extracto	32
2.2.3. Aislamiento y purificación de Rioloatriona	32
2.2.3.1. Columna cromatográfica FLASH (19:1)	33
2.2.3.2. Columna cromatográfica FLASH (60:40)	33
2.2.3.3. Obtención de cristales de Rioloatriona	34
2.2.3.4. Sistema de elución de Cromatografía en Capa Fina para monitoreo de fracciones	34
2.2.3.5. Sistema de elución de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para monitoreo de fracciones	35
2.2.4. Desarrollo de la formulación a base de Rioloatriona	35
2.2.4.1. Pruebas de estabilidad de Rioloatriona en condiciones de Autoclave.	36
2.2.4.2. Preparación de soluciones de vehículos farmacéuticos	36
2.2.4.3. Pruebas pre-formulación de Rioloatriona en vehículos farmacéuticos	37
2.2.4.4. Desarrollo de una solución oftálmica de Rioloatriona.	37
2.2.4.5. Desarrollo de una suspensión oftálmica de Rioloatriona.	38
2.2.4.6. Desarrollo de un ungüento oftálmico de Rioloatriona.	39
2.2.5. Determinación de las características fisicoquímicas de las formulaciones desarrolladas de Rioloatriona	39

2.2.6. Evaluación de la actividad <i>in vivo</i> contra VHS-1 de las formulaciones desarrolladas en un modelo experimental murino.	41
2.2.7. Análisis estadístico	43
<b>3. RESULTADOS</b>	44
3.1. Identidad y pureza del compuesto Rioloatriona purificado.	44
3.1.1. Pureza cromatográfica	44
3.1.2. Pureza espectroscópica.	46
3.2. Desarrollo de una formulación tópica a base de Rioloatriona.	47
3.2.1. Estabilidad de Rioloatriona en condiciones de autoclave.	47
3.2.2. Pruebas pre-formulación de Rioloatriona en vehículos farmacéuticos.	48
3.2.3. Desarrollo de una solución oftálmica de Rioloatriona.	49
3.2.4. Desarrollo de una suspensión oftálmica de Rioloatriona.	51
3.2.5. Desarrollo de un ungüento oftálmico de Rioloatriona.	52
3.3. Determinación de las características fisicoquímicas de las formulaciones desarrolladas.	55
3.3.1. Caracterización de la solución oftálmica de Rioloatriona (0.2 % p/v).	55
3.3.2. Caracterización del ungüento oftálmico de Rioloatriona (0.3 % p/p).	62
3.3.3. Estabilidad de las formulaciones desarrolladas.	66
3.4. Evaluación de la actividad <i>in vivo</i> contra VHS-1 de las formulaciones desarrolladas en un modelo experimental murino.	72
3.5. Análisis estadístico.	76
<b>4. DISCUSIÓN</b>	77
4.1. Obtención de Rioloatriona pura.	78
4.2. Desarrollo de una formulación tópica a base de Rioloatriona.	79

4.3. Caracterización fisicoquímica de las formulaciones desarrolladas.	88
4.4. Estabilidad de las formulaciones desarrolladas.	92
4.5. Evaluación de la actividad <i>in vivo</i> contra VHS-1 de las formulaciones desarrolladas	93
<b>5. CONCLUSIONES</b>	98
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	99
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	100
<b>8. ANEXOS</b>	105

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Estructura del Virus del Herpes Simplex Tipo 1	2
2	Ulceración dendrítica de queratoconjuntivitis herpética	7
3	Fotografía de la planta <i>Jatropha dioica</i>	15
4	Estructura química del diterpenoide Rioloatriona	17
5	Resultados del estudio piloto de la actividad <i>in vivo</i> del extracto HA de <i>J. dioica</i>	24
6	Cromatografía en Capa Fina: <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Rioloatriona purificada.	45
7	Cromatogramas CLAR-DAD: <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Rioloatriona purificada.	46
8	Espectros <sup>1</sup> H-RMN en CDCl <sub>3</sub> : <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Rioloatriona purificada.	47
9	Espectros de <sup>1</sup> H-RMN en CDCl <sub>3</sub> : <b>a)</b> Rioloatriona de referencia. <b>b)</b> Rioloatriona purificada después del ciclo de Autoclave, se observa una señal deformada (*).	48
10	<b>a)</b> Solución oftálmica desarrollada; <b>b)</b> Solución oftálmica a las 24 horas con presencia de precipitado.	50
11	Solución oftálmica de Rioloatriona al 0.2% (p/v) en 2-Hidroxipropil-β-Ciclodextrina al 15% (p/v): <b>a)</b> Solución oftálmica desarrollada; <b>b)</b> Solución oftálmica a los 30 días.	51
12	<b>a)</b> Suspensión oftálmica desarrollada al 0.2% (p/v); <b>b)</b> Micrografía de la Suspensión oftálmica desarrollada con presencia de cristales (→).	52
13	Ungüento de Rioloatriona al 0.3% (p/p)	53
14	Micrografías a 40X en microscopio óptico de luz y microscopio óptico de luz invertido: <b>a)</b> Vaselina blanca	54

	comercial empleada; <b>b)</b> Blanco de ungüento; <b>c)</b> Ungüento de Rioloatriona al 0.3% (p/p).	
<b>15</b>	Micrografías de soluciones oftálmicas: <b>a)</b> Blanco de solución; <b>b)</b> Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 1; <b>c)</b> Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 2; <b>d)</b> Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 3.	57
<b>16</b>	Cromatografía en Capa Fina de soluciones oftálmicas: <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Blanco de solución; <b>c)</b> Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 1; <b>d)</b> Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 2; <b>e)</b> Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 3.	58
<b>17</b>	Espectros $^1\text{H}$ -RMN en $\text{D}_2\text{O}$ : Comparación de espectros de <b>a)</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v); <b>b)</b> Blanco de solución.	59
<b>18</b>	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN: Comparación de espectros de <b>a)</b> Rioloatriona de Referencia en MeOD; <b>b)</b> Rioloatriona de referencia en $\text{CDCl}_3$ ; <b>c)</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) en $\text{D}_2\text{O}$ .	60
<b>19</b>	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN en $\text{CDCl}_3$ : Comparación de espectros de <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) extraída <i>in situ</i> con $\text{CDCl}_3$	61
<b>20</b>	Micrografías de ungüentos oftálmicos: <b>a)</b> Blanco de ungüento; <b>b)</b> Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 1; <b>c)</b> Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 2; <b>d)</b> Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 3.	63
<b>21</b>	Cromatografía en Capa Fina de ungüentos oftálmicos: <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Blanco de ungüento; <b>c)</b> Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 1; <b>d)</b> Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 2; <b>e)</b> Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 3.	64
<b>22</b>	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN en $\text{CDCl}_3$ : Comparación de espectros de <b>a)</b> Rioloatriona de referencia; <b>b)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p), señales atribuidas a la Rioloatriona (*); <b>c)</b> Blanco de ungüento.	65
<b>23</b>	Cromatografía en Capa Fina de soluciones oftálmicas: <b>a)</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a 30 días; <b>b)</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a 60 días; <b>c)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.2% p/v) a 90 días. ( <b>1-</b> Rioloatriona de referencia; <b>2-</b> Blanco de solución a temperatura ambiente; <b>3-</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a temperatura ambiente; <b>4-</b> Blanco de solución a estabilidad acelerada; <b>5-</b> Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a estabilidad acelerada.)	67

<b>24</b>	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN en $\text{D}_2\text{O}$ : Comparación de espectros de <b>a)</b> Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 0 días; <b>b)</b> Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 30 días; <b>c)</b> Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 60 días; <b>d)</b> Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 90 días; en condiciones de estabilidad acelerada.	68
<b>25</b>	Cromatografía en Capa Fina de ungüentos oftálmicos: <b>a)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a 30 días; <b>b)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a 60 días; <b>c)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a 90 días. ( <b>1-</b> Rioloatriona de referencia; <b>2-</b> Blanco de ungüento a temperatura ambiente; <b>3-</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a temperatura ambiente; <b>4-</b> Blanco de ungüento a estabilidad acelerada; <b>5-</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a estabilidad acelerada.)	70
<b>26</b>	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN en $\text{D}_2\text{O}$ : Comparación de espectros de <b>a)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a los 0 días; <b>b)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a los 30 días; <b>c)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a los 60 días; <b>d)</b> Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) a los 90 días; en condiciones de estabilidad acelerada.	71
<b>27</b>	Esquema de infección y tratamiento en el modelo murino de queratoconjuntivitis herpética por VHS-1. <b>p.i.:</b> post-infección; <b>Tx:</b> Tratamiento.	72
<b>28</b>	Evolución de la infección herpética ocular en ratones Balb/c y evidencia del efecto del tratamiento según la formulación aplicada a cada grupo de ratones, como se indica a la izquierda de la figura.	73
<b>29</b>	Reducción de la diseminación y severidad viral en base a los criterios clínicos establecidos. Los códigos de los grupos de ratones tratados y no tratados se muestran a la derecha de la gráfica.	74
<b>30</b>	Reducción de la diseminación y severidad viral en base a los criterios clínicos establecidos y la comparación de los efectos de las formulaciones utilizadas en este estudio: <b>a)</b> Aciclovir 2.5% (p/v), contra Solución de Rioloatriona. y <b>b)</b> Aciclovir 2.5% (p/v), contra Ungüento de Rioloatriona	75
<b>31</b>	Histograma de las medias de puntuaciones con los valores p resultantes ( $p < 0.05$ ) de la comparación múltiple de Tukey de los grupos de ratones.	76

<b>32</b>	Estructura química y conformación de ciclodextrinas	82
<b>33</b>	Características de las ciclodextrinas nativas	83
<b>34</b>	Forma hipotética de los complejos Riolozatriona/HP $\beta$ CD formados en la solución oftálmica.	85



## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>I</b>	Métodos de diagnóstico de VHS-1	10
<b>II</b>	Productos naturales con actividad anti-herpética	14
<b>III</b>	Sistemas para la administración tópica ocular de ciclosporina A.	19
<b>IV</b>	Características ideales de una formulación oftálmica	20
<b>V</b>	Modelos experimentales <i>in vivo</i> de infección con VHS	21
<b>VI</b>	Escala clínica de infección ocular	23
<b>VII</b>	Condiciones de análisis por CLAR	35
<b>VIII</b>	Características fisicoquímicas medidas a cada formulación	40
<b>IX</b>	Escala clínica de queratitis estromal	43
<b>X</b>	Solubilidad de Rioloatriona en vehículos farmacéuticos a distintas condiciones.	49
<b>XI</b>	Análisis macroscópico de las soluciones de 2-Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina al 15% (p/v) a tres concentraciones de Rioloatriona.	50
<b>XII</b>	Concentraciones de Rioloatriona probadas para el ungüento.	53
<b>XIII</b>	Características de la solución oftálmica de Rioloatriona al 0.2 % (p/v).	56
<b>XIV</b>	Características del ungüento oftálmico (0.3% p/p).	62
<b>XV</b>	Características físicas de la solución de Rioloatriona.	66
<b>XVI</b>	Características físicas del ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p)	69
<b>XVII</b>	Valor p resultante del análisis ANOVA de un factor aplicado a los datos obtenidos.	76

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcentaje
<b>µg</b>	Microgramos
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<b>Ác.</b>	Ácido
<b>ACV</b>	Aciclovir
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>CCF</b>	Cromatografía en Capa Fina
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CLAR</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
<b>cols.</b>	Colaboradores
<b>cP</b>	Centipoises
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada
<b>DAD</b>	Detector de Arreglo de Diodos
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FM</b>	Fase Móvil
<b>g</b>	Gramo
<b>HA</b>	Hidro-alcohólico
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HPβCD</b>	2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina
<b>hrs</b>	Horas
<b>Hz</b>	Hertz
<b>kbp</b>	Pares de kilobases
<b>MeOD</b>	Metanol deuterado
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro

<b>N. L.</b>	Nuevo León
<b>NS</b>	No estructurales
<b>° C</b>	Grados Celsius
<b>p.i.</b>	Post-infección
<b>p/p</b>	Peso/peso
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>PACA</b>	Poli-alquil-cianoacrilato
<b>PBS</b>	Buffer de fosfatos
<b>PCL</b>	Poli-ε-caprolactona
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>REF.</b>	Referencia
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SEM</b>	Skin, Eyes and Mucosa
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TK</b>	Timidina cinasa
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography
<b>UANL</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León
<b>UFP</b>	Unidades Formadoras de Placas
<b>VHS-1</b>	Virus del Herpes Simplex Tipo 1
<b>VHS-2</b>	Virus del Herpes Simplex Tipo 2
<b>α</b>	Alfa
<b>α-CD</b>	Alfa-Ciclodextrina
<b>β</b>	Beta
<b>β-CD</b>	Beta-Ciclodextrina
<b>γ</b>	Gama
<b>γ-CD</b>	Gama-Ciclodextrina

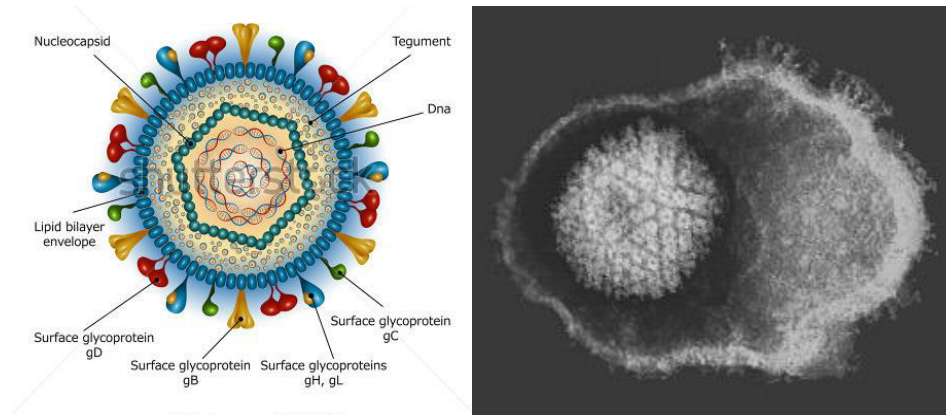
## CAPITULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Virus del Herpes simplex

El herpes es una enfermedad emergente, causada por la infección del virus del Herpes simplex tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2). La infección por VHS-1 es altamente contagiosa, frecuente y endémica en todo el mundo, se adquiere mayoritariamente durante la infancia y dura toda la vida. Esta enfermedad es caracterizada por la aparición de vesículas eritematosas en piel, principalmente en cara, labios y nariz.

El VHS-1 (figura 1) pertenece a la Familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, es un virus icosaédrico y está formado por hasta 162 capsómeros tubulares que rodean un núcleo de ADN de doble cadena. Dicho núcleo está rodeado de una estructura amorfa llamada tegumento y en forma más externa se encuentra una envoltura lipoprotéica; también es posible hallar partículas sin envoltura. El diámetro de la partícula desnuda se aproxima a los 100 nm y el del virus envuelto completo es de 120 a 200 nm. (1)



**Figura 1:** Virus del Herpes Simplex Tipo 1

El virus posee un genoma de ADN de doble cadena lineal cuyo peso molecular varía entre 125 y 229 kbp, y codifica para 80 a 100 polipéptidos, muchos de los cuales son proteínas NS, incluso una ADN polimerasa fundamental para la replicación, además codifica para una enzima fosforilante, una timidina cinasa (TK) esencial para activar ciertos medicamentos antivirales. Las proteínas estructurales se encuentran en la nucleocápside, el tegumento y la envoltura lipídica. (1)

### 1.1.1 Transmisión

La transmisión de este virus se da principalmente por contacto de boca a boca, por contacto con vesículas y secreciones; además se puede transmitir a la zona genital por contacto buco-genital y aunque es raro, puede transmitirse de la madre infectada al recién nacido durante el parto. En ocasiones, la infección puede ser transmitida a la córnea a través del tacto, lo que causa

queratoconjuntivitis, la cual ocasiona dolor intenso, visión borrosa, ulceración dendrítica y posteriormente puede conducir a ceguera. (2).

### **1.1.2 Replicación viral**

La glucoproteína C, una proteína de fijación, se une a los proteoglicanos celulares junto con otras glucoproteínas virales (B, D y H), las cuales participan en un proceso de fusión complejo de la envoltura lipídica viral con la membrana plasmática. Posteriormente, la cápside viral es transportada al poro nuclear, donde el ADN lineal es liberado e ingresa al núcleo de la célula donde se llevan a cabo la mayoría de las actividades de transcripción, replicación viral y ensamblaje de la cápside. El virus induce la interrupción de la síntesis de proteína y ácido nucleico del hospedero.

Inicialmente se aprecia una actividad explosiva de transcripción de los genes virales tempranos y, poco más tarde, al iniciarse la replicación del ADN viral, se transcriben los genes intermedios y tardíos. No es raro que todo el proceso esté bajo control estricto. La proteína tegumentaria del virus estimula la transcripción de las moléculas de ARNm de los genes  $\alpha$ -tempranos-inmediatos, que una vez transferidas al citoplasma, inician la traducción a proteínas  $\alpha$ . En conjunto éstas son proteínas transreguladoras que controlan la expresión de los genes  $\beta$  y  $\gamma$  tardíos.

Las proteínas  $\beta$  son principalmente enzimas como: timidina cinasa (TK), ADN polimerasa y helicasa, necesarias para la replicación del ADN viral. Las partículas de ARNm y se activan después de la replicación del ADN viral y codifican para proteínas estructurales.

Mediante un mecanismo circular se sintetiza ADN viral nuevo y los fragmentos divididos apropiados se agrupan para empaquetarse nucleocápsides que migran a la membrana nuclear, donde se combinan con proteínas del tegumento viral y de la envoltura. Se produce gemación a través de la membrana nuclear y los virus envueltos se agrupan en el RE antes de ser liberados de la membrana. (1)

### **1.1.3 Patogénesis**

La piel y las mucosas son los portales de entrada del virus, donde infecta y se replica en las células mucoepiteliales causando lisis celular y formación de vesículas. Las vesículas se rompen pronto para dar lugar a úlceras de profundidad media, pero la piel permanece intacta por varios días antes de que se formen costras y cicatrices. El líquido claro de las vesículas contiene un gran número de viriones.

Poco después de iniciada la replicación en piel o mucosas los viriones migran a los ganglios de la raíz dorsal a través de la inervación sensorial del área. Las infecciones primarias en las áreas oro-facial y genital afectan respectivamente

los ganglios de las raíces dorsales de los nervios trigémino y lumbosacro. En los ganglios el virus ingresa en estado de latencia sin causar la muerte de las células, y el mecanismo exacto de la interacción del genoma viral con la célula no se comprende del todo. En cada célula con infección latente se encuentran varias copias del genoma viral, las cuales existen en forma extracromosómica dentro del núcleo y se lleva a cabo la transcripción de sólo una pequeña porción del genoma, por lo tanto, no se sintetizan polipéptidos virales tempranos o tardíos. (1, 2)

La mayoría de las recurrencias de las infecciones se deben a una reactivación del virus a partir de células ganglionares con infección latente. Se desconocen los mecanismos implicados en la reactivación del virus, pero se sabe que los factores participantes en ello son la exposición a la luz ultravioleta, la luz solar, fiebre, exaltación, estrés emocional y traumatismos como los ocasionados por entubación. (1, 3)

#### **1.1.4 Manifestaciones clínicas**

***Infección bucofaríngea:*** con frecuencia la infección primaria se adquiere durante la lactancia o en los primeros años de la vida, por contacto estrecho con una persona de mayor edad, a menudo a través de un beso. En muchos casos la infección es asintomática, pero podría manifestarse como gingivoestomatitis aguda: aparecen vesículas en las encías y la mucosa bucal, que posteriormente se rompen para formar úlceras, las lesiones afectan la parte anterior de la boca



y a menudo abarcan los labios y la piel circumbucal. El tiempo que transcurre desde el inicio hasta la cicatrización es de unas dos semanas. Más adelante en la vida se manifiestan recurrencias en torno a la boca, por lo regular en el borde labial, más leves y de menor duración que las infecciones primarias o iniciales. (1)

***Infección dérmica:*** las infecciones primarias de la piel son frecuentes en personal de cuidados de la salud que manejan secreciones bucales con las manos. La infección se da en dedos y uñas y es denominada panadizo herpético, es el resultado de la inoculación de secreciones infectadas a través de alguna pequeña cortada en la piel. Se desarrollan lesiones vesiculares dolorosas que forman pústulas en los dedos; a menudo se confunden con una infección bacteriana (con una paroniquia bacteriana) y, por ende, se les da un tratamiento inadecuado. (1)

***Queratoconjuntivitis herpética:*** es una infección ocular por VHS-1 y es una de las causas más comunes de daño corneal y ceguera en países desarrollados. Por lo general, las infecciones afectan la conjuntiva y la córnea y se producen ulceraciones dendríticas características, así llamadas porque parecen estar ramificadas (figura 2).



**Figura 2.** Ulceración dendrítica de Queratoconjuntivitis Herpética

También suele abarcar el estroma de la córnea (Queratitis disciforme) y una de sus complicaciones más graves es la iridociclitis. Con la recurrencia de la enfermedad, es posible que se presente un compromiso más profundo con cicatrización corneal. En ocasiones, puede extenderse a las estructuras más profundas del ojo, en especial, cuando se utilizan esteroides tópicos. (1, 2).

***Encefalitis herpética:*** es una enfermedad grave que amenaza la vida y presenta alto índice de secuelas neurológicas. Es inusual que una infección por VHS-1 la ocasione, pero la mayoría de los casos se presentan en adultos con altos niveles de anticuerpos anti-VHS-1, lo que sugiere una reactivación del virus latente en la raíz ganglionar del nervio trigémino y extensión de la infección productiva (lítica) hacia el área temporoparietal del cerebro. Con frecuencia es de inicio gradual, con malestar general y fiebre que duran pocos días; luego sobrevienen cefaleas y cambios de comportamiento. Un signo pronóstico indeseable es la obnubilación que progresa a coma. Sin tratamiento la mortalidad alcanza alrededor del 70%, mientras que quienes sobreviven muestran índice alto de secuelas neurológicas incluso con defectos mentales. (1)

***Herpes genital:*** se debe a la infección del área genital causada principalmente por VHS-2, aunque también puede ser causada por VHS-1, y es transmitida sexualmente. En varones se manifiesta como una serie de vesículas en el pene; es posible encontrar lesiones en el meato urinario causantes de disuria. Algunos homosexuales desarrollan proctitis herpética. En mujeres las lesiones aparecen en labios, vulva y perineo, pero a veces se extienden a la superficie interna de los muslos. También se desarrolla cervicitis con lesiones vesiculares. Pacientes de ambos sexos padecen linfadenopatía inguinal importante, con frecuencia acompañada de fiebre y malestar general leve. Es probable que la recurrencia de infecciones por VHS-2, sean más frecuentes que las debidas a VHS-1. (1).

***Herpes neonatal:*** es la infección del recién nacido (dentro de los 28 días de su nacimiento) resultante de la exposición al VHS-2 en el tracto genital durante el parto, aunque también pueden ocurrir infecciones en el útero y postnatales. También puede ser causado por el VHS-1, aunque es menos probable. Las presentaciones clínicas se han dividido en 3 categorías, cada una asociada con diferentes resultados y manifestaciones. (4)

1. Infección confinada a piel, ojos y mucosas (SEM), corresponde alrededor del 45% de los casos, a menudo presentan lesiones vesiculares en la piel, ojos y mucosas, esta infección no compromete al SNC ni a órganos viscerales. Los niños con SEM a menudo presentan infecciones recurrentes de herpes cutáneo durante la infancia.
2. Infección asociada al SNC, corresponde al 30% de los casos y está asociada con letargo, mala alimentación y convulsiones, con o sin lesiones

cutáneas. Los infectados pueden presentar retraso en el desarrollo, epilepsia, ceguera y discapacidades cognitivas.

3. Infección diseminada, corresponde al 25% de los casos y es la mayor fatalidad del VHS neonatal, esta envuelve múltiples órganos como pulmones, hígado y cerebro; y aparentemente es clínicamente indistinguible de una sepsis bacteriana. El riesgo de muerte es alto (30%) aun cuando se lleva un tratamiento antiviral.

### **1.1.5 Epidemiología**

En el año 2012 se estimó que más de 3.700 millones de personas menores de 50 años estaban infectadas por el virus del herpes simple de tipo 1 (VHS-1), lo cual representa el 67% de la población mundial. Además, se estimó que aproximadamente 140 millones de personas con edades comprendidas entre los 15 y los 49 años sufren infección genital por este virus. La prevalencia estimada de la infección fue mayor en África que en las Américas. (5)

Es importante mencionar que en México no se cuentan con datos epidemiológicos acerca de la infección por VHS-1.

### 1.1.6 Diagnóstico

Existen diversos métodos de diagnóstico de infección por VHS-1 que se utilizan en la práctica clínica. (6) En la tabla I se muestran dichos métodos, así como las ventajas y desventajas de éstos.

**TABLA I:** Métodos de diagnóstico de VHS-1.

<b>MÉTODO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>Cultivo</b>	Días a semanas	Especificidad máxima; sensibilidad casi siempre adecuada; se dispone del aislamiento para su caracterización.	Se necesitan instalaciones para cultivo de tejidos; el tiempo necesario para hacer el diagnóstico puede ser prolongado.
<b>Detección de antígeno</b>	Horas a un día	Rapidez del diagnóstico; se utiliza cuando es difícil realizar el cultivo del virus.	Falsos negativos y falsos positivos; dificultad para pruebas masivas.
<b>PCR</b>	Uno o varios días	Máxima sensibilidad; especificidad casi siempre adecuada.	Se necesitan instalaciones para análisis moleculares; posible contaminación cruzada; problemas con los inhibidores.
<b>qPCR</b>	Horas	Excelente sensibilidad y especificidad; velocidad de diagnóstico.	Se requieren instalaciones para análisis moleculares.
<b>Serología</b>	Semanas	Determinación de la inmunidad, se utiliza cuando es difícil realizar el cultivo del virus.	Potenciales reacciones cruzadas; necesidad de contar con muestras del período agudo y convaleciente

### 1.1.7 Tratamiento

Se han desarrollado varios fármacos antivirales que inhiben el VHS. El más efectivo y comúnmente utilizado es el análogo nucleósido Aciclovir. La FDA de los Estados Unidos de América ha aprobado tanto al valaciclovir y famciclovir para el tratamiento de VHS recurrente. Es importante remarcar que el tratamiento puede reducir la intensidad y frecuencia de los síntomas, pero no curan la infección. (2)

- **Aciclovir:** se convierte por medio de la enzima viral TK, a una forma monofosfato y, después, por las enzimas celulares a la forma trifosfato, que es un inhibidor potente de la ADN polimerasa viral. El Aciclovir disminuye la duración de la infección primaria de manera significativa y tiene un efecto menor, pero definitivo, sobre las infecciones mucocutáneas recurrentes por VHS. Si se toma a diario, también puede detener las recurrencias de VHS genital y bucolabial. En su forma intravenosa es efectivo para reducir la mortalidad de la encefalitis por VHS y del herpes neonatal
- **Valaciclovir:** es un profármaco oral del Aciclovir con una mejor biodisponibilidad que el Aciclovir (54% en comparación con 15 a 20%). Se convierte con rapidez a Aciclovir y, en cada característica a excepción de su absorción, es idéntico al compuesto original. El valaciclovir no es más eficaz que el Aciclovir, pero se puede administrar en dosis más pequeñas y con menor frecuencia.

- **Famciclovir:** es el profármaco de otro análogo del nucleósido de la guanosina, el penciclovir. La biodisponibilidad del penciclovir también es alta (77%). Después de su conversión, el penciclovir debe fosforilarse, al igual que el Aciclovir, pero este tiene una vida media hística mucho más larga y se puede administrar a dosis más bajas.

Debido a que la infección latente no requiere de las síntesis de polipéptidos virales tempranos o tardíos, los fármacos antivirales dirigidos contra enzimas como timidina cinasa o ADN polimerasa viral no erradican al virus en la etapa latente. (3)

Se han aislado cepas de VHS resistentes a Aciclovir a partir de pacientes inmunocomprometidos con lesiones persistentes, en especial de aquellos con SIDA. Se han realizado estudios que han asociado la resistencia del VHS, principalmente a mutaciones en los genes de TK y de ADN polimerasa del virus. (7)

## **1.2 Productos naturales con actividad antiviral**

Debido a la resistencia del VHS-1 a los antivirales convencionales se han buscado nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones causadas por este virus, dentro de estas alternativas se encuentran las plantas medicinales, conocidas por ser fuente de nuevos medicamentos debido a la presencia de metabolitos secundarios, los cuales tienen efectos terapéuticos sobre distintos organismos.

A lo largo de los años se han estudiado una variedad de productos naturales que han presentado actividad antiviral, especialmente contra VHS-1 y VHS-2, tanto *in vitro* como *in vivo*, como se muestra en la Tabla II.

La actividad antiviral de los productos naturales indica que las plantas medicinales son una fuente importante para el desarrollo de nuevos medicamentos.



**Tabla II: Productos naturales con actividad anti-herpética**

PRODUCTO NATURAL	ESTUDIO	AÑO	REF.
<b><i>Aglaia odorata</i>, <i>Ventilago denticulata</i> y <i>Moringa oleífera</i>.</b>	Evaluaron la actividad Anti-VHS-1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de 20 extractos de plantas medicinales Thai. Emplearon el ensayo de reducción de placas y un modelo experimental murino de infección cutánea. Los extractos con mejor actividad <i>in vitro</i> fueron probados <i>in vivo</i> administrados por vía oral mostrando eficacia terapéutica.	2003	(8)
<b><i>Carissa edulis</i></b>	Evaluaron la actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra VHS-1 y VHS-2 tanto de cepas wild type como de cepas resistentes. El extracto acuoso de la raíz de la planta demostró actividad reduciendo la formación de placas de ambas cepas de ambos virus. El modelo experimental fueron ratones con infección cutánea, infectados con ambas cepas y tratados de manera oral con el extracto a una dosis de 250 mg/Kg donde se demostró que retrasaban el establecimiento de la infección y aumentó la supervivencia de los ratones.	2006	(18)
<b>Ácido caféico</b>	Se demostró la actividad contra VHS-1 y VHS-2 <i>in vitro</i> mediante el empleo del ensayo de reducción de placas.	1999	(9),(12) (13)
<b>Curcumina, cineole y eugenol</b>	Se demostró la actividad contra VHS-2 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Emplearon el ensayo de reducción de placas y un modelo experimental de infección intravaginal con VHS-2. El cineol y curcumina presentaron actividad similar, mientras que el eugenol presentó los resultados más prometedores en el modelo murino.	1999	(9) (12)
<b>Cis-capsaicina</b>	Emplearon un modelo experimental (cobayo) de herpes genital, donde demostraron la reducción de las infecciones primarias y, además, la recurrencia de infecciones latentes por VHS cuando eran tratados de manera semanal con el compuesto como terapia de mantenimiento supresor.	1999	(9) (16)
<b>Kaempferol y galagina</b>	Demostraron que estos compuestos contenidos en propóleos son los que tienen mayor actividad contra VHS, reduciendo los títulos virales, además demostraron que tienen efecto sinérgico.	1992	(9) (10)
<b>Isoborneol</b>	Se demostró actividad contra VHS-1 <i>in vitro</i> en células infectadas, donde el compuesto fue capaz de inactivar al virus con 30 min de exposición, y fue capaz de inhibir la replicación viral en su totalidad a bajas concentraciones (0.06%)	1999	(9) (11)
<b>Ácido morónico y betulónico.</b>	Demostraron la actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra VHS-1. El ácido morónico presentó mejor actividad, además se probó la actividad de este contra cepas resistentes a antivirales. Se empleó un modelo experimental murino de infección cutánea, donde el Ác. morónico fue capaz de reducir las lesiones cutáneas.	1999	(9) (14)
<b>Alcaloide FK3000</b>	Se demostró la actividad <i>in vivo</i> contra VHS-1 en ratones infectados subcutáneamente, donde el tratamiento con el compuesto redujo las lesiones de la piel y prolongo el tiempo de supervivencia.	2001	(9) (15)
<b>Meliacina</b>	Demostraron la actividad <i>in vivo</i> contra VHS-1 en un modelo experimental murino de infección ocular. El tratamiento se administró de manera tópica 3 veces al día durante 3 días consecutivos, y observaron una reducción de la incidencia y severidad de blefaritis, neovascularización y queratitis estromal. Además, se demostró la reducción de la multiplicación viral en el ojo.	2002	(9) (17)

### 1.3 *Jatropha dioica*

*Jatropha dioica* (Fig. 3) es un arbusto común en las regiones áridas del Noreste de México, el cual pertenece a la Familia *Euphorbiaceae*, es conocida localmente como “Sangre de drago” y fue llamada “tlapelex patli” por los aztecas. Su tamaño es de aproximadamente 70 cm, sus ramas son de color rojizo, produce un látex característico de color amarillo que al contacto con el aire se oxida y su color cambia a rojo.



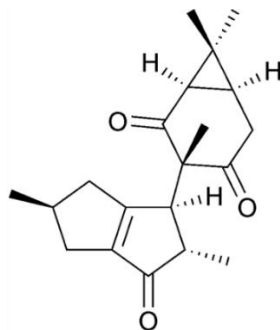
**Figura 3.** Fotografía de la planta *Jatropha dioica*

Las raíces han sido empleadas como astringente, para la prevención de la caída del cabello, fortificar los dientes, tratar hemorroides, enfermedades de la piel y hongos, para cortar flujos vaginales, entre otras. Además, se han demostrado diversas actividades biológicas de extractos obtenidos a partir de las raíces. (19)

Domínguez, X. A. y cols. (22) demostraron la actividad antibiótica del extracto de éter de petróleo contra *Staphylococcus aureus*; de igual forma, Silva-Belmares y cols. (20) demostraron la actividad antimicrobiana del extracto hexánico de la raíz contra múltiples microorganismos como *Bacillus cerus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Sporothrix schenckii*, y *Cryptococcus neoformans*; y recientemente Silva-Mares y cols. (21) demostraron la actividad anti-herpética contra VHS-1 y VHS-2 del extracto hidro-metanólico de la planta, a su vez realizaron el aislamiento biodirigido de la Rioloatriona, compuesto responsable de dicha actividad.

#### **1.4 Rioloatriona**

Es un compuesto de tipo diterpenoide de estructura única (figura 4), aislado a partir de la planta *Jatropha dioica* por primera vez por Domínguez y cols. (22) Recientemente se ha demostrado su actividad anti-herpética moderada *in vitro* contra VHS-1 y VHS-2. (23). Aún se desconoce el mecanismo de acción de la Rioloatriona contra los virus, así como su actividad anti-herpética *in vivo*.



**Figura 4.** Estructura química del diterpenoide Riolozatriona

### 1.5 Formulaciones farmacéuticas

Para realizar estudios *in vivo* de compuestos nuevos, es necesario establecer la mejor forma de formularlos para facilitar su administración en el modelo experimental. Entre las formulaciones oftálmicas más comunes se encuentran los ungüentos, las suspensiones y las soluciones.

- a) Ungüentos oftálmicos: son preparados farmacéuticos de consistencia blanda que contienen al activo, pueden emplearse bases liposolubles o hidrosolubles, deben ser estériles y libres de partículas extrañas.
- b) Suspensiones oftálmicas: son sistemas dispersos, compuestos de dos fases, las cuales contienen el o los activos y aditivos. Deben ser estériles y con un tamaño de partícula no mayor a 10  $\mu\text{m}$ .

- c) Soluciones oftálmicas: son preparados líquidos, claros y homogéneos, obtenidos por disolución del activo y aditivos en agua u otro disolvente. Se formulan para que sean estériles, isotónicas, libres de partículas extrañas y reguladas con buffer para que sean estables y cómodas.

Nuestro activo de estudio, la Rioloatriona, es un compuesto insoluble en agua, lo que representa un reto para su administración. Existen estudios en los cuales se ha buscado nuevas formas de solubilizar activos poco solubles en agua para facilitar su administración en el ojo. Lallemand, F. y cols. (25) realizaron un artículo reseña de sistemas comúnmente empleados para solubilizar y administrar la Ciclosporina A, producto natural insoluble en agua. (Tabla III).

**Tabla III:** Sistemas para la administración tópica ocular de ciclosporina A.

SISTEMAS	FORMULACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	REF
<b>Soluciones</b>	<i>Aceites</i>	Alta capacidad de solubilización de la CsA	Poca Tolerancia Partición no favorable.	(26)
	<i><math>\alpha</math>-ciclodextrinas</i>	Penetración corneal mejorada	Administraciones repetidas	(27) (28)
	<i>Potenciadores de penetración</i>	Penetración corneal mejorada	Poca tolerancia	(29) (30)
<b>Transportadores coloidales</b>	<i>Micelas</i>	Altas concentraciones en córnea a las 24 hrs.	Limitada estabilidad de las micelas	(31)
	<i>Emulsión cargada negativamente</i>	Mejorías en los síntomas del ojo seco. Aprobadas por la FDA	Irritación ocular	(32) (33)
	<i>Emulsión cargada positivamente</i>	Mejoran el tiempo de retención en córnea, altos niveles en córnea y conjuntiva.	Tolerancia a ser evaluada	(34)
	<i>Liposomas</i>	Buena tolerancia, mejoras en el tiempo de supervivencia de injertos corneales.	Tiempo retención corneal corto	(35)
	<i>Nanopartículas PCL</i>	Mejoran el tiempo de retención extra-ocular, aumento de la absorción corneal.	Sin efecto en injertos corneales	(36)
	<i>Nanopartículas PACA</i>	Mejoras en la absorción corneal	Poca tolerancia	(37)
	<i>Nanopartículas quitosán</i>	Buena tolerancia, altas concentraciones extra-oculares	Origen natural del quitosán	(38)
<b>Formas sólidas</b>	<i>Capa protectora de colágeno</i>	Efecto de vendaje, altos niveles en córnea	Inconformidad de los pacientes. No auto-administración.	(39)
	<i>Capa protectora de colágeno + liposomas</i>	Liberación lenta y continua, altas concentraciones en tejido	Complejidad de manufactura	(40)
	<i>Partículas de colágeno</i>	Efectivas en la prevención del rechazo de injertos corneales.	Ninguna mejora significativa en la concentración del fármaco	(41)

Hernando, E. y Del Río, L. A. llevaron a cabo un estudio de distintos colirios de CsA para la selección de los vehículos más adecuados para su administración, así como la caracterización de los mismos, y su aplicación en pacientes para verificar su efectividad y tolerancia. La formulación que resultó más adecuada fue la elaborada con miristato de isopropilo. (24)

Específicamente, las formulaciones tópicas oftálmicas deben de presentar ciertas características óptimas (Tabla IV)

**Tabla IV:** Características ideales de una formulación oftálmica

• Compatibilidad en la formulación (Principio activo-excipiente y excipiente-excipiente)
• Estabilidad química
• No irritante al ojo
• No tóxico
• pH 7.0-7.4 (6.0-8.0)
• Viscosidad adecuada (15-25 centipoises)
• Isotonicidad (0.9% de NaCl)
• Esterilidad
• Tamaño de partícula <10 $\mu\text{m}$ (para suspensiones y ungüentos)
• Libre de partículas extrañas

## 1.6 Modelos experimentales para el estudio de actividad antiviral

Los modelos animales o modelos *in vivo*, son empleados en la evaluación preclínica de compuestos inhibidores de la replicación viral además de brindar información exclusiva sobre la respuesta del organismo a la infección. Estos modelos son sistemas experimentales de mucha utilidad en la investigación ya que permiten el uso de técnicas de análisis que no pueden usarse en humanos debido a los códigos éticos.

En la actualidad se emplean diferentes modelos experimentales para el estudio de las infecciones causadas por VHS-1 y VHS-2, así como para el estudio de nuevos tratamientos para estas. Valdés, S. M. y cols. (42) publicaron un artículo reseña en el cual explican los modelos animales utilizados en el estudio preclínico de antivirales contra el Virus del Herpes Simplex, los cuales se muestran en la Tabla V.

**Tabla V:** Modelos experimentales *in vivo* de infección con VHS.

VIRUS	MODELO	CUADRO CLÍNICO	MEDIDA DE INFECCIÓN
VHS-1	Ratón	Encefalitis	Mortalidad, conducta
	Conejo		
	Conejo	Enfermedad Ocular (Queratitis herpética)	Severidad de la lesión, título viral
	Ratón		
	Curiel	Lesión de piel	
	Ratón	Herpes genital	
	Curiel		



VHS-2	Ratón	Herpes neonatal diseminado	Mortalidad
	Ratón	Encefalitis	
	Curiel	Herpes genital	Severidad, título y recurrencia.

De los modelos animales empleados en la infección de VHS-1, el de la enfermedad ocular en ratones Balb/c, es de nuestro interés, debido a que es el modelo ampliamente utilizado en nuestro grupo de trabajo. Además, presenta ventajas como la fácil manipulación de ratones y los costos son menores comparados con modelos más grandes, como los conejos.

Torres, E. realizó un estudio piloto en el año 2013, con el modelo de queratoconjuntivitis herpética de Morrison y Knipe (44) el cual es semejante al modelo de enfermedad ocular mencionado anteriormente, donde los ratones infectados fueron tratados con extractos hidro-alcohólicos de *J. dioica* a tres concentraciones distintas (150, 300 y 500 µg/mL).

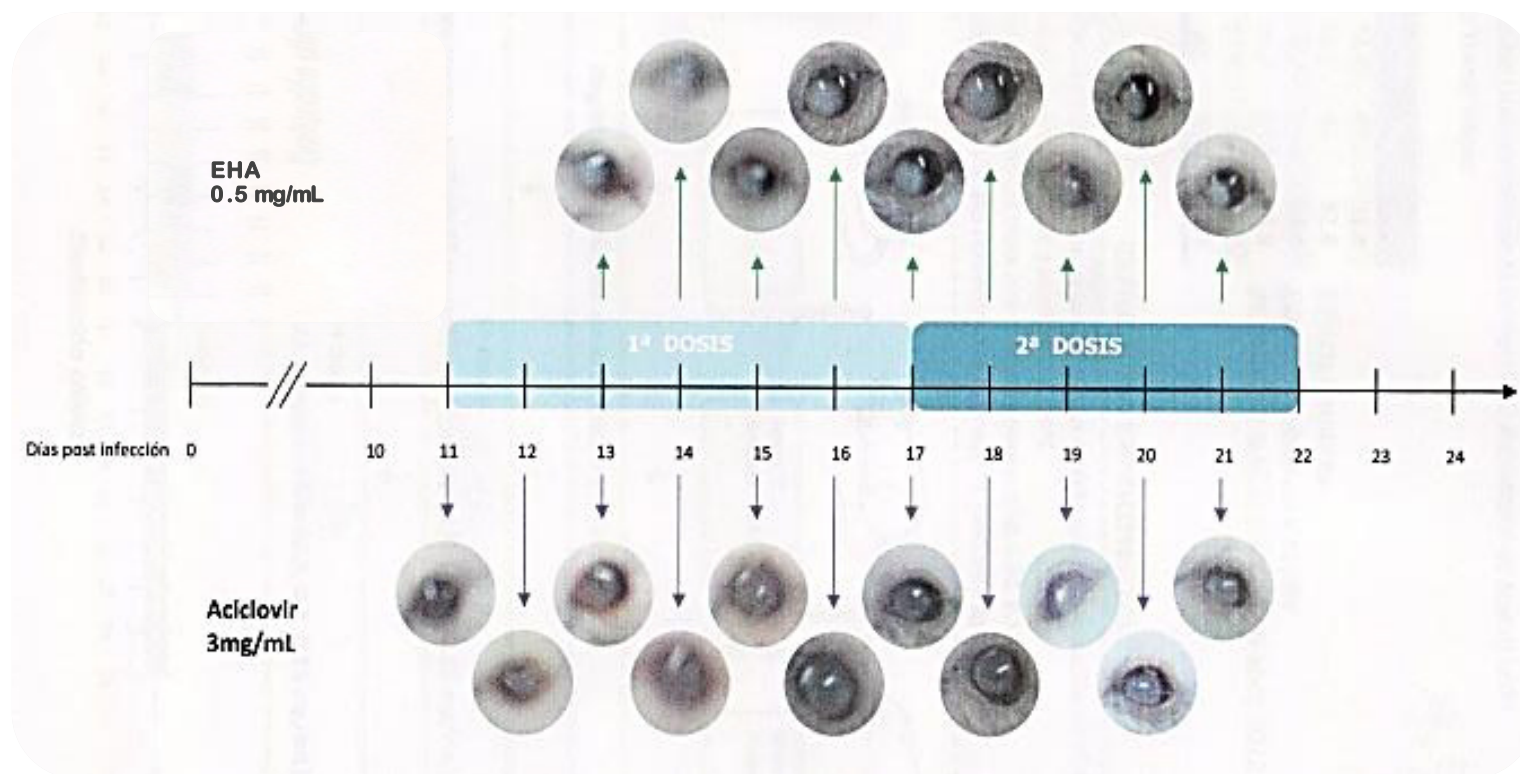
Para ese estudio se evaluaron cuatro grupos de ratones Balb/c, de los cuales dos grupos fueron control de la infección (Control positivo y negativo), un grupo control de tratamiento antiviral (ACV 3 mg/mL) y un grupo con el tratamiento (extracto HA a tres concentraciones distintas). Los ratones fueron tratados con una primera dosis a los 11 días post-infección y con una segunda dosis a los 17 días post-infección; llevando un registro diario de la evolución de la infección y cuadro clínico siguiendo la escala clínica de infección ocular. (Tabla VI)

**Tabla VI:** Escala clínica de infección ocular

<b>ESCALA</b>	<b>CRITERIOS</b>
<b>0</b>	Cornea Normal
<b>0.5</b>	Lesiones Punctatas
<b>1.0</b>	Lesiones Dendríticas
<b>1.5</b>	Edema Estromal con Lesiones Geográficas
<b>2.0</b>	Involucro Estromal, Pupilas e Iris Visible
<b>3.0</b>	Involucro Estromal, Pupilas e Iris Invisible
<b>4.0</b>	Queratitis Severa, Pupilas e Iris Invisible

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos con el extracto HA a 500 µg/mL con el cual se logró una recuperación semejante a la del control positivo de ACV.

Alché et. al. (43) y Pifarre et. al. (17), emplearon este modelo para el estudio de un producto natural (Meliacina) como potencial antiviral.



**Figura 5.** Resultados de estudio piloto de la actividad *in vivo* del extracto HA de *J. dioica*

## 1.7 Justificación

Debido al aumento de reportes de aislados clínicos de VHS-1 con resistencia a los antivirales convencionales, es importante la búsqueda de nuevos compuestos activos contra este virus, una alternativa son los productos naturales.

La Rioloatriona es un producto natural con demostrado efecto anti-herpético moderado *in vitro*, sin embargo, no se cuenta con información sobre su comportamiento en organismos complejos, por ello es necesario su estudio en un modelo experimental murino para evaluar su actividad anti-herpética *in vivo*.

### **1.8 Objetivo general**

Estudiar el efecto antiviral de una formulación a base de Rioloatriona en un modelo experimental murino de queratoconjuntivitis herpética.

### **1.9 Objetivos específicos**

1. Desarrollar una formulación tópica a base de Rioloatriona.
2. Determinar las características fisicoquímicas de la formulación desarrollada.
3. Evaluar la actividad *in vivo* contra VHS-1 de la formulación desarrollada, en un modelo experimental murino.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1 Material, Reactivos y Equipo.**

##### **2.1.1 Material Biológico**

- Concentrado viral de VHS-1, cepa HSV-1 KOS (ATCC® VR-1493™)
- Raíz de la planta *Jatropha dioica* (UAN-24077)
- Ratones machos Balb/c, de 6 a 12 semanas de edad.

##### **2.1.2 Material de laboratorio**

- Acrodiscos PVDF 45 mm de diámetro con filtro de 0.22 µm Millipore®
- Capilares de 2, 5 y 10 µL Dade Diagnostics, Inc.®
- Columna AccQ·Tag C<sub>18</sub> 3.9 x 150 mm, tamaño de partícula 4 µm, Waters®
- Columnas cromatográficas de vidrio, PYREX® con esmeril 24/40.
- Cromatofolios TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> MERCK®
- Cubas CAMAG para TLC
- Cubreobjetos, 22 x 22 mm, CORNING®

- Embudos de filtración rápida
- Espátulas de metal
- Filtros para HPLC de nylon para solventes, Waters®
- Gasas en cuadros 10 X 10 cm estériles.
- Gradillas para 60 tubos de ensayos
- Guantes de Nitrilo
- Hisopos de alginato de calcio, Fisher Brand®
- Jeringas estériles de 1, 5, 10 y 20 mL con aguja.
- Parafilm, (Laboratory film)
- Matraces bola de 50, 200, 500 y 1000 mL, PYREX® con esmeril 24/40.
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL, PYREX®
- Papel Filtro No. 40 WHATMAN®
- Pinzas de disección
- Pinzas tres dedos
- Pipetas automáticas de 100-1000  $\mu$ L, Transferpette® y Eppendorf®
- Pipetas automáticas de 20-200  $\mu$ L, Transferpette® y Eppendorf®
- Pipetas Pasteur
- Placas de porcelana 12 pozos
- Pomaderas de vidrio ámbar
- Portaobjetos
- Probeta 10, 25, 100, 500 y 1000 mL, KIMAX®
- Puntillas para pipeta automática, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L

- Puntillas para pipeta automática, 100 µL, 200 µL y 1000 µL estériles con filtro.
- Silica gel 60 for column chromatography (0.040-0.063 mm) MERCK®
- Tubos de ensayo 13x100 mm KIMAX®
- Tubos de ensayo 15x150 mm KIMAX®
- Tubos Eppendorf® de 1.5 mL,
- Vasos de precipitado 250 mL, PYREX®
- Vasos de precipitado 500 mL, PYREX®
- Viales de vidrio 2 mL AGILENT TECH®.

### 2.1.3 Disolventes

- Acetato de etilo, ACS, Fermont®
- Acetona, RA, CTR Scientific®
- Acetonitrilo, HPLC Grade, J. T. Baker®
- Agua deuterada 99.9%, Aldrich®
- Agua MilliQ
- Alcohol metílico, RA, CTR Scientific®
- Cloroformo deuterado 99.8% D, Sigma®
- Cloruro de metileno, RA, CTR Scientific®
- Éter de petróleo, Fermont®
- Éter etílico, Mallinckrodt®



- Hexano, RA, CTR Scientific®
- Miristato de isopropilo, Aldrich®
- Propilenglicol, Analytika®

#### **2.1.4 Reactivos**

- Anestésicos (Xilacina 2% (v/v) y Ketamina 100 mg/mL)
- Aceite de oliva Extra virgen
- $\alpha$ -Ciclodextrina,  $\geq 98\%$ , Sigma®
- 2-Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, PM-1460, sustitución molar 0.8, Aldrich®.
- Cloruro de benzalconio, Alfa Aesar®
- Gas Nitrógeno (N<sub>2</sub>) PRAXAIR®
- Tween 20 Sigma-Aldrich®
- Tween 80 Sigma®

#### **2.1.5 Equipos**

- Autoclave Market Forge® Sterilmatic
- Balanza analítica SCIENTECH®
- Balanza analítica OHAUS®
- Balanza granataria ScoutOhaus®
- Bomba KNAUER Advanced Scientific Instruments

- Campana de flujo laminar BSL-2
- Cromatógrafo de Líquidos Analítico Waters 2695 con DAD Waters 2996.
- Espectrómetro RMN 400 MHz Bruker® Avance III HD, equipado con gradiente de campo.
- Estufa, Fischer Scientific®
- Lámpara de LUV Spectroline® ENF 260C
- Microscopio óptico EAGLE® CM 240
- Placa de agitación multiplaza, RO 5, IKA®
- pH metro OHAUS® Starter 3100
- Placas de calentamiento Thermo Scientific®
- Rotavapor Laborota 4000 HEIDOLPH con baño de agua
- Agitador, Heidolph UNIMAX 1010
- Ultrasonido modelo 2510 marca Branson®
- Viscosímetro, Mod. DVZTLV, Brookfield®

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Colecta de planta

La colecta de la planta *Jatropha dioica* se realizó en el ejido “El Potrero” ubicado en el municipio de Villaldama, N. L. Especímenes de la planta se enviaron al

Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su identificación y comprobación de la especie.

Se realizó lavado con agua a presión y cepillado de la planta colectada para la eliminación de restos de tierra, se separó la parte aérea de la raíz y se empleó solamente la raíz de la planta. Se cortó en trozos, se secó a temperatura ambiente y se molió hasta pulverizar.

### **2.2.2 Obtención del extracto**

Por cada 60 g de planta molida se emplearon 600 mL de Cloruro de metileno, la extracción se llevó a cabo con agitación constante durante una hora y posteriormente permaneciendo en reposo durante toda la noche a temperatura ambiente, esto se realizó en tres repeticiones. Los extractos se filtraron y se llevaron a sequedad por evaporación a presión reducida a una temperatura de 37 °C en un equipo rotaevaporador. El extracto se colocó en pomaderas de color ámbar y fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su posterior uso.

### **2.2.3 Aislamiento y purificación del Compuesto Rioloatriona**

Se realizaron columnas cromatográficas a partir del extracto obtenido de la planta para la obtención de Rioloatriona.

### **2.2.3.1 Columna cromatográfica FLASH (19:1)**

Condiciones:

- Fase estacionaria: Silica gel 60
- Fase móvil: Cloruro de Metileno/Acetona (19:1)

Se sembraron 2 g de extracto de *J. dioica* en la columna y se eluyó con la fase móvil, se colectaron 40 fracciones de 20 mL, se realizó un monitoreo por cromatografía en capa fina de cada fracción (2.2.3.4) y posteriormente por CLAR (2.2.3.5). Las fracciones que contenían a la Riolozatriona se juntaron y se llevaron a sequedad para posteriormente realizar otra separación cromatográfica con la metodología descrita en la sección 2.2.3.2.

### **2.2.3.2 Columna cromatográfica FLASH (60:40)**

Condiciones:

- Fase estacionaria: Silica gel 60
- Fase móvil: FM1: Hexano/Acetato de Etilo (60:40)  
FM2: Hexano/Acetato de Etilo (40:60)  
FM3: Acetato de Etilo (100)

Se sembró en la columna 2 g de fracción obtenida en la columna Cloruro de Metileno/Acetona (19:1) y se eluyó con 1000 mL de FM1, seguidos de 500 mL de FM2 y por último 500 mL de FM3; se colectaron 80 fracciones de 20 mL y se

realizó un monitoreo por cromatografía en capa fina de cada fracción (2.2.3.4) y posteriormente por CLAR (2.2.3.5). Las fracciones que contenían a la Rioloatriona se juntaron y se llevaron a sequedad para realizar la cristalización del compuesto Rioloatriona.

### **2.2.3.3 Obtención de cristales de Rioloatriona**

A las fracciones de Rioloatriona obtenidas con la Columna Cromatográfica FLASH (60:40) se les agregó éter etílico: éter de petróleo en una proporción 4:1 y se dejó cristalizar en refrigeración (4 °C) durante toda la noche. Los cristales obtenidos fueron lavados con éter etílico y se les realizó un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN para analizar la pureza del compuesto.

### **2.2.3.4 Sistema de elución de Cromatografía en Capa Fina para monitoreo de fracciones**

Se utilizaron cromatofolios TLC de Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck®, se emplearon 20 mL con 5 min de saturación de la cuba, con el siguiente sistema de eluentes: Hexano/Acetato de etilo (60:40).

### 2.2.3.5 Sistema de elución de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para monitoreo de fracciones

Se disolvió 1 mg de cada fracción en 1 mL de Acetonitrilo y se inyectó en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución con las condiciones mostradas en la Tabla VII.

**TABLA VII:** Condiciones de análisis por CLAR

<b>Columna</b>	AccQ Tag, Waters 3.9 x 150 mm AA Analysis		
<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo/Agua		
	Minuto	% AcN	% Agua
<b>Gradiente</b>	0	50	50
	35	100	0
	40	100	0
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL		
<b>Flujo</b>	0.2 mL/min		
<b>Temperatura de columna</b>	25° C		
<b>Tiempo de análisis</b>	40 minutos		
<b>Detector</b>	Detector de Arreglo de Diodos		

### 2.2.4 Desarrollo de una formulación tópica a base de Rioloatriona

Para el desarrollo de formulaciones tópicas, se hicieron pruebas de estabilidad de Rioloatriona, se prepararon soluciones del compuesto con distintos vehículos

farmacéuticos y se hicieron pruebas pre-formulación de éstas, finalmente se prepararon tres formulaciones oftálmicas de Rioloatriona (solución, suspensión y ungüento).

#### **2.2.4.1 Prueba de Estabilidad de Rioloatriona en condiciones de Autoclave**

Se pesaron 2 mg del Rioloatriona en un vial de vidrio de 2 mL, se colocó en la Autoclave Market Forge® Sterilmatic a 116° C durante 20 minutos, se retiró de la autoclave, se dejó enfriar, se le realizó un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  y se comparó con el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del estándar de Rioloatriona en  $\text{CDCl}_3$  para ver algún cambio en las señales que evidencien alteraciones en la estructura del compuesto.

#### **2.2.4.2 Preparación de soluciones de vehículos farmacéuticos.**

Se prepararon soluciones de vehículos a las concentraciones utilizadas en formulaciones oftálmicas. Los vehículos y concentraciones utilizados fueron los siguientes:

- Tween 20 y Tween 80 al 1% (v/v) en solución salina estéril.
- Cloruro de Benzalconio al 0.01% (p/v) en solución salina estéril.

- Propilenglicol, miristato de isopropilo, aceite mineral y aceite de oliva se utilizaron al 100% sin realizar alguna solución.

#### **2.2.4.3 Pruebas pre-formulación de Rioloatriona en vehículos farmacéuticos**

A 2 mg de Rioloatriona se le agregaron 100  $\mu$ L de las soluciones preparadas en el apartado 2.2.4.2 y se dejó en agitación constante durante 24 hrs. Finalmente, se realizó una observación macroscópica.

#### **2.2.4.4. Desarrollo de una solución oftálmica de Rioloatriona**

Se probaron dos vehículos farmacéuticos la  $\alpha$ -Ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) y la 2-hidroxib- $\beta$ -ciclodextrina (HP $\beta$ CD).

1. Se preparó una solución de  $\alpha$ -CD al 5% (p/v) en solución salina, posteriormente, se agregó la cantidad necesaria de Rioloatriona para obtener una concentración al 0.05% (p/v), se mantuvo en agitación constante a 1,000 rpm durante 4 horas. Posteriormente, se filtró con ayuda de un sistema de Acrodisco PVDF 45 mm de diámetro con filtro de 0.22  $\mu$ m Millipore® y se colocó en un vial previamente esterilizado por autoclave.



2. Se preparó una solución de HP $\beta$ CD al 15% (p/v) en solución salina, posteriormente se agregó la cantidad necesaria de Rioloatriona para obtener una concentración de 0.2, 0.5 y 1% (p/v) respectivamente, se mantuvo en agitación constante a 1,000 rpm durante 4 horas. Posteriormente, se filtró con ayuda de un sistema de Acrodisco PVDF 45 mm de diámetro con filtro de 0.22  $\mu$ m Millipore® y se colocó en un vial previamente esterilizado por autoclave.

Cada solución se sometió a un análisis macroscópico para establecer la homogeneidad y correcta incorporación de la Rioloatriona en las soluciones.

#### **2.2.4.5. Desarrollo de una suspensión oftálmica de Rioloatriona**

Se preparó una solución con propilenglicol, Tween 80 e hipromelosa en solución salina, posteriormente, se agregó la cantidad necesaria de Rioloatriona para obtener una concentración al 0.2% (p/v), se agitó a 1,000 rpm por 4 horas y en ultrasonido durante 2 horas.

La suspensión obtenida se sometió a un análisis macroscópico y microscópico para establecer la homogeneidad, la correcta incorporación de la Rioloatriona en las suspensiones y verificar el tamaño y forma de las partículas.

.

#### **2.2.4.6. Desarrollo de un ungüento oftálmico de Riolozatriona**

Para el desarrollo del ungüento se empleó el método de fusión, donde la vaselina blanca y la vaselina líquida se colocan en un baño de agua a 75 °C en agitación constante, se agregó la cantidad necesaria de Riolozatriona a la vaselina blanca para obtener el ungüento al 0.3, 0.5 y 1% (p/p). Posteriormente, se incorporó a la vaselina blanca en agitación constante y se esterilizó en autoclave a 116 °C por 20 minutos.

Se probaron 3 concentraciones de Riolozatriona: 0.3, 0.5 y 1% (p/p).; una vez disuelta la Riolozatriona se incorporó a la Vaselina blanca agitándose durante unos minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y al final cada ungüento se sometió a un análisis macroscópico para establecer la homogeneidad y correcta incorporación de la Riolozatriona en las soluciones como microscópico.

#### **2.2.5 Determinación de las características fisicoquímicas de las formulaciones desarrolladas.**

Se realizaron tres lotes de cada formulación y se tomaron alícuotas de 1 a 8 mL para determinar las características fisicoquímicas presentadas en la Tabla VIII.

Se realizó el mismo procedimiento con cada una de las formulaciones sin Rioloatriona (blanco de formulación).

**Tabla VIII:** Características fisicoquímicas medidas a cada formulación.

CARACTERÍSTICA	EVALUACIÓN
pH	Se realizó la medición en un pH metro OHAUS® Starter 3100, con el empleo de 3 calibradores (4.01, 7.01, 10.01) y se siguió la metodología sugerida por el fabricante.
Viscosidad	Se realizó el análisis en un Viscosímetro, Modelo DVZTLV, Brookfield® siguiendo la metodología sugerida por el fabricante.
Homogeneidad	Cada lote de formulación fue sometido a una inspección en Microscopio óptico EAGLE® CM 240. Se colocó una cantidad representativa de la muestra en un portaobjetos, se añadió un colorante adecuado para cada formulación, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se analizó bajo el microscopio empleando el objetivo de 40X. Se realizó la búsqueda de sólidos dispersos y partículas extrañas.
Caracterización Química	A cada lote se le realizó una extracción con distintos solventes y posteriormente se llevó a cabo el análisis por CCF y RMN, mediante el empleo de metodologías estandarizadas en nuestro laboratorio.
Estabilidad	Se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-073-SSA1-2005. Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa durante 3 meses. Las condiciones utilizadas fueron: a) 25° C, 40% de HR y b) 40 ± 2 °C y 75 ± 5% de HR. Lotes de cada formulación con Rioloatriona como blancos fueron evaluados. Se evaluaron características físicas como cambios de color, presencia de sedimentos, separación de fases; y características químicas mediante técnicas CCF y RMN.
Esterilidad	Se realizó un cultivo microbiológico durante 14 días siguiendo el Método MGA 0381 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) donde se buscó la presencia de bacterias, hongos y levaduras. Esto se subrogó al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.

### **2.2.6 Evaluación de la actividad *in vivo* contra VHS-1 de las formulaciones desarrolladas, en un modelo experimental murino.**

Los estudios se realizaron en ratones machos inmunocompetentes de la cepa Balb/c, de 6 a 12 semanas de edad, con un peso de 20-25 g, estos estuvieron distribuidos en cajas de polietileno en grupos de cuatro ratones por caja, fueron mantenidos en condiciones normales de alimentos Purina® para roedores y agua purificada en condiciones de bioterio BSL-2, en el Departamento de Inmunología. Se emplearon un total de 40 ratones.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de Ketamina (100 mg/Kg) y Xilacina (7 mg/Kg), vía intraperitoneal, posteriormente se realizó la escarificación de ambas córneas con bisel de aguja estéril en forma de cuadrícula; después se adicionaron 5 µL de solución salina al grupo control negativo de la infección y al resto de los grupos 5 µL de la suspensión viral a una dosis de  $1 \times 10^5$  UFP, a partir de un concentrado viral de VHS-1 (KOS) contenidos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). (44)

Nueve días después de la infección se trataron por vía oftálmica de la siguiente manera:

- Grupo 1 (control negativo de infección): 4 ratones machos tratados con 10 µL de PBS.

- Grupo 2 (control positivo de infección): 4 ratones machos tratados con 10  $\mu$ L de PBS.
- Grupo 3 (control positivo de actividad antiviral): 4 ratones machos tratados con 10  $\mu$ L de solución comercial de Aciclovir (2.5% p/v).
- Grupo 4 (blanco de la solución oftálmica): 4 ratones machos tratados con 10  $\mu$ L del blanco de la solución oftálmica.
- Grupo 5 (solución oftálmica de Rioloatriona): 4 ratones machos tratados con 10  $\mu$ L de la solución oftálmica de Rioloatriona (0.2% p/v).
- Grupo 6 (blanco del ungüento oftálmico): 4 ratones machos tratados con 50 mg del blanco de ungüento oftálmico.
- Grupo 7 (ungüento oftálmico de Rioloatriona): 4 ratones machos tratados con 50 mg del ungüento oftálmico de Rioloatriona (0.3% p/p).

El área ocular de los ratones se evaluó diariamente con lupa de aumento u oftalmoscopio, con el objetivo de encontrar datos de lesión ocular o datos del comportamiento del animal que indiquen infección sistémica y/o reducción de la infección herpética. Cada ojo recibió una escala de severidad del 0 al 4 como se muestra en la Tabla IX.

Las puntuaciones asignadas a cada uno de los ojos de los ratones fueron graficadas y analizadas.

**TABLA IX:** Escala clínica de queratitis estromal (44,45)

<b>Escala</b>	<b>Criterios</b>
<b>0</b>	Córnea Normal
<b>1</b>	Ligera turbidez corneal, algunos detalles del iris visibles
<b>2</b>	Opacidad corneal moderada con detalles del iris oscurecidos.
<b>3</b>	Daño estromal, pupila e iris visible con opacidad severa.
<b>4</b>	Queratitis severa, pupila e iris no visible, necrosis.

### **2.2.7 Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos de las puntuaciones asignadas a cada uno de los ojos de los 4 ratones fueron promediados para cada grupo y se trataron en el programa GraphPad Prism 7 aplicando un análisis de ANOVA de un factor, seguido de una comparación múltiple de Tukey.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

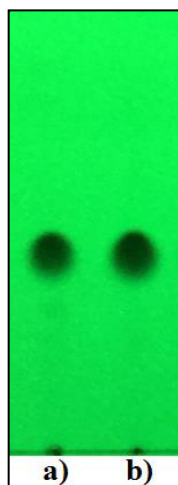
#### **3.1. Identidad y pureza del compuesto Riolozatriona purificado**

Se obtuvieron 1.3 g de Riolozatriona a partir de 1.5 kg de la raíz molida y seca de *J. dioica* mediante la metodología descrita en la *sección 2.2.3*. La Riolozatriona purificada se sometió a un análisis de pureza e identidad mediante Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear con el uso de Riolozatriona de referencia como estándar.

##### **3.1.1. Pureza cromatográfica**

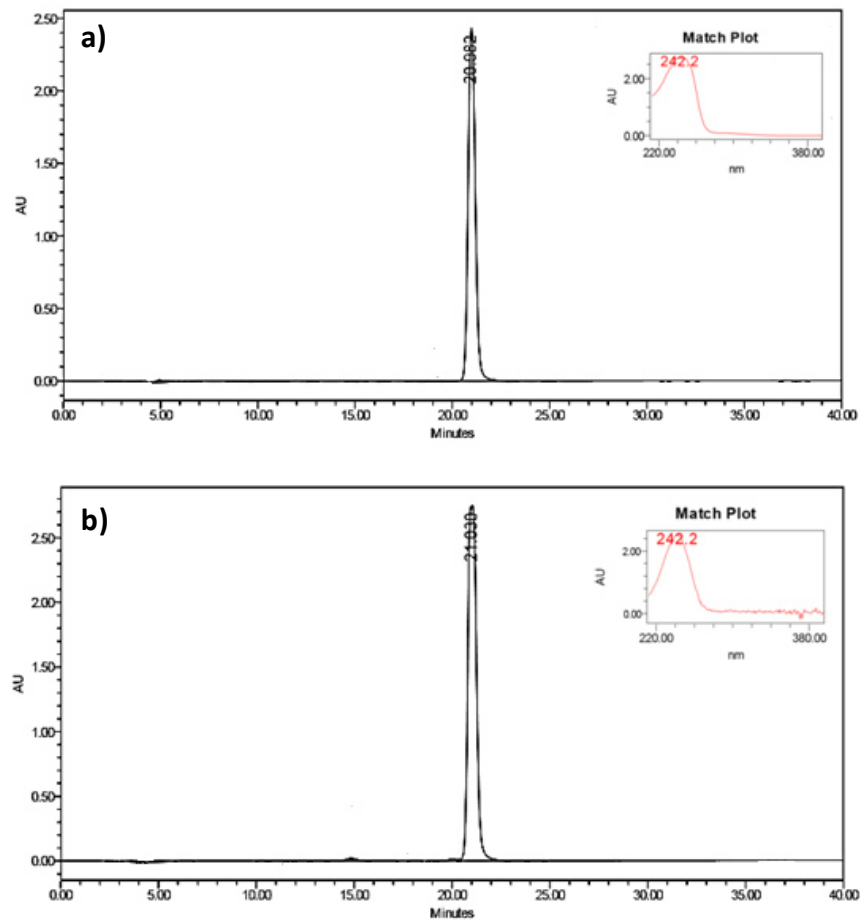
En la figura 6 se muestra la CCF de la Riolozatriona obtenida y de la Riolozatriona de referencia siguiendo la metodología descrita en la *sección 2.2.3.4*. En la figura 7 se muestran los cromatogramas de la Riolozatriona purificada y la Riolozatriona

de referencia, obtenidos mediante CLAR siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.3.5.



**Figura 6.** Cromatografía en Capa Fina: **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Rioloatriona purificada.

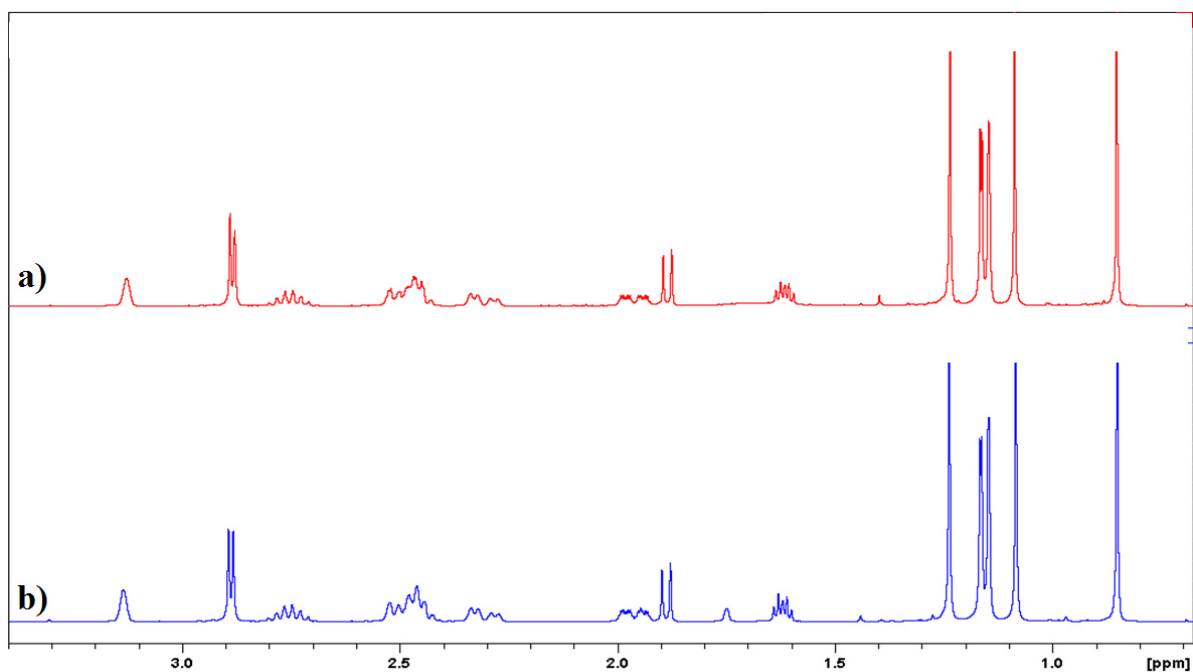




**Figura 7.** Cromatogramas CLAR-DAD: **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Rioloatriona purificada.

### 3.1.2. Pureza espectroscópica

En la figura 8 se muestra la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la Rioloatriona purificada y la Rioloatriona de referencia.

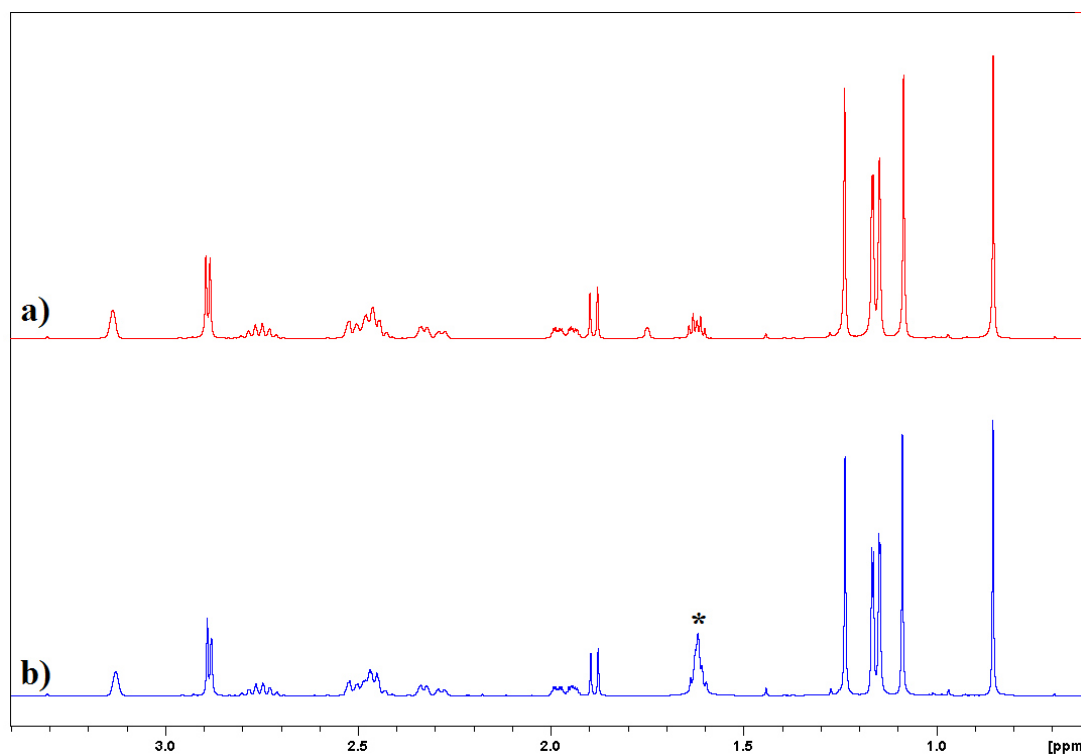


**Figura 8.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ : **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Rioloatriona purificada.

### 3.2. Desarrollo de una formulación tópica a base de Rioloatriona

#### 3.2.1. Estabilidad de Rioloatriona en condiciones de autoclave

Se trabajó con una muestra de Rioloatriona purificada y fue sometida a un ciclo de autoclave a 116 °C durante 20 minutos, en la figura 9 se muestra una comparación del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra de Rioloatriona tratada y de la Rioloatriona de referencia.



**Figura 9.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ : **a)** Rioloatriona de referencia. **b)** Rioloatriona purificada después del ciclo de autoclave, se observa una señal deformada (\*).

### 3.2.2. Pruebas pre-formulación de Rioloatriona en vehículos farmacéuticos.

Se realizó un ensayo de solubilidad de 2 mg de Rioloatriona en 100  $\mu\text{L}$  de distintos vehículos farmacéuticos, en la Tabla X se encuentran los resultados de este ensayo. Con base en los resultados de estas pruebas se seleccionaron los vehículos farmacéuticos a emplearse en cada formulación.

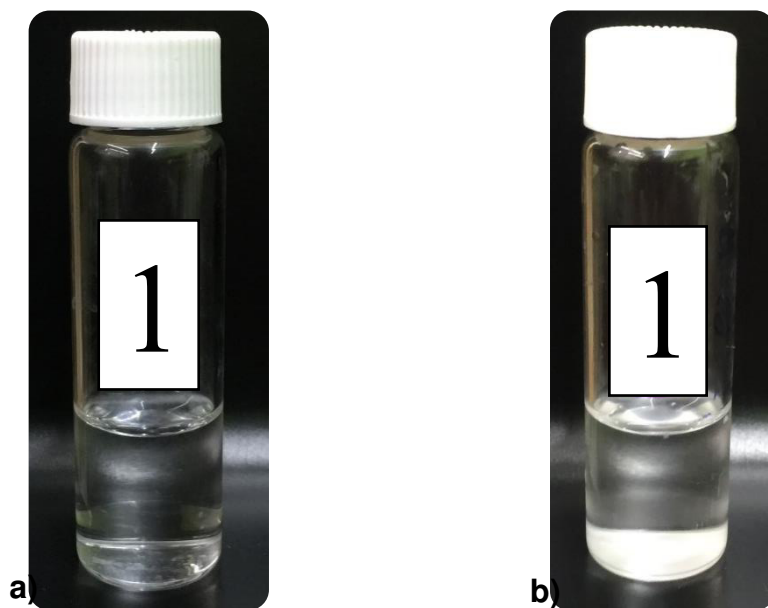
**Tabla X.** Solubilidad de Riolozatriona en vehículos farmacéuticos a distintas condiciones.

<b>Vehículo Farmacéutico</b>	<b>Solubilidad de Riolozatriona</b>
<i>Agua inyectable</i>	Insoluble
<i>Aceite Mineral (25 °C)</i>	Insoluble
<i>Aceite Mineral (75 °C)</i>	Soluble
<i>Tween 80 (1%)</i>	Insoluble (Partículas suspendidas)
<i>Tween 20 (1%)</i>	Insoluble (Partículas suspendidas)
<i>Miristato de isopropilo</i>	Soluble
<i>Cloruro de Benzalconio (0.01%)</i>	Insoluble
<i>Propilenglicol</i>	Soluble
<i>Aceite de Oliva (25 °C)</i>	Insoluble
<i>Aceite de Oliva (75 °C)</i>	Soluble
<i>PVA (14 mg/mL)</i>	Insoluble
<i>Hipromelosa (0.5%)</i>	Insoluble

### 3.2.3. Desarrollo de una solución oftálmica de Riolozatriona.

En la figura 10 se muestran las imágenes de la formulación de la solución oftálmica de Riolozatriona al 0.05% (p/v) en  $\alpha$ -ciclodextrina al 5% (p/v). Se obtuvieron soluciones oftálmicas de Riolozatriona a tres diferentes concentraciones en 2-Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina (15% p/v), en la Tabla XI se muestran los resultados obtenidos para las distintas concentraciones de

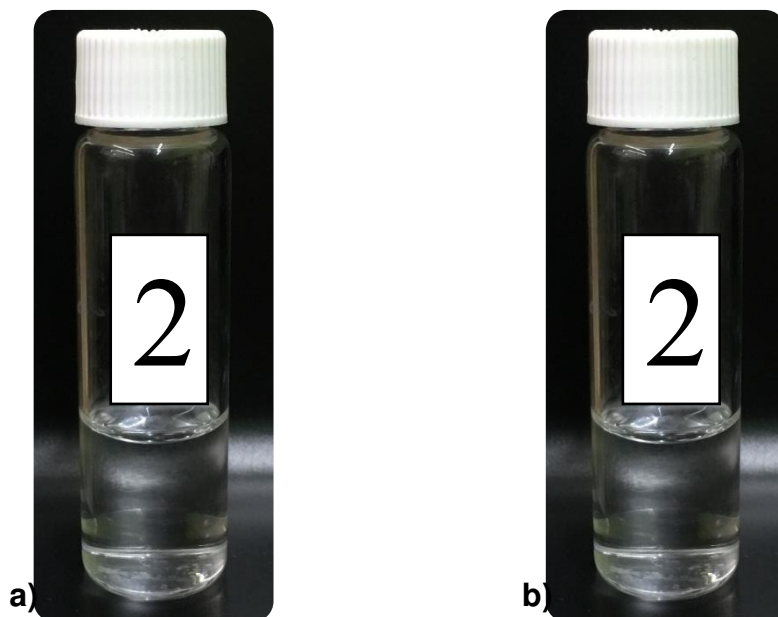
Rioloatriona probadas, y en la figura 11 se muestran las imágenes de la formulación obtenida a la concentración que mostró mejores resultados.



**Figura 10.** a) Solución oftálmica desarrollada; b) Solución oftálmica a las 24 horas con presencia de precipitado.

**Tabla XI.** Análisis macroscópico de las soluciones de 2-Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina al 15% (p/v) a tres concentraciones de Rioloatriona.

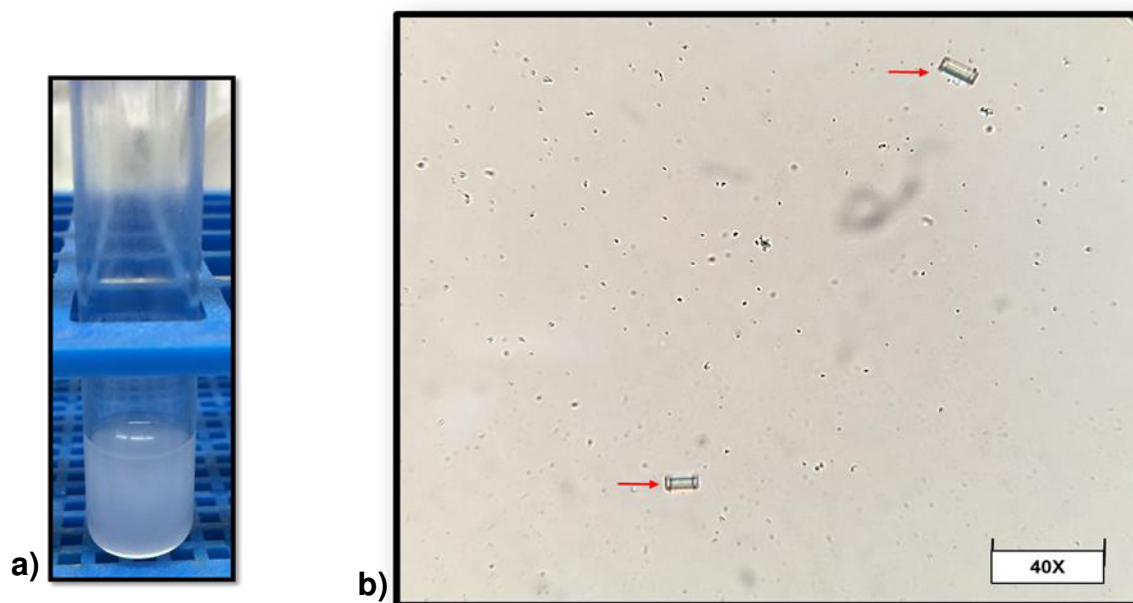
Concentración de Rioloatriona en HP $\beta$ CD (15% p/v)		
0.2%	0.5%	1%
La Ciclodextrina fue capaz de solubilizar la cantidad de Rioloatriona probada.	La Ciclodextrina no fue capaz de solubilizar la cantidad de Rioloatriona probada.	La Ciclodextrina no fue capaz de solubilizar la cantidad de Rioloatriona probada.



**Figura 11.** Solución oftálmica de Riolozatriona al 0.2% (p/v) en 2-Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina al 15% (p/v): **a)** Solución oftálmica desarrollada; **b)** Solución oftálmica a los 30 días.

#### **3.2.4. Desarrollo de una suspensión oftálmica de Riolozatriona.**

Se realizó el desarrollo de la suspensión oftálmica de Riolozatriona al 0.2% (p/v) empleando distintos excipientes como se describe en la sección 2.2.4.5. En la figura 12 se muestran imágenes de la suspensión desarrollada.



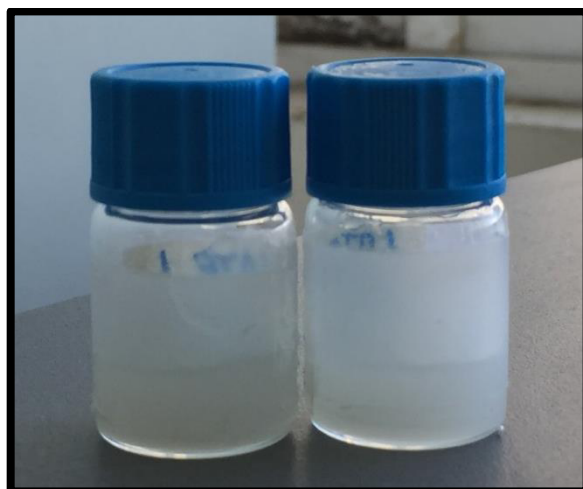
**Figura 12. a)** Suspensión oftálmica desarrollada al 0.2% (p/v); **b)** Micrografía de la suspensión oftálmica desarrollada con presencia de cristales (→).

### 3.2.5. Desarrollo de un ungüento oftálmico de Riolozatriona.

Se realizó la preparación del ungüento oftálmico de Riolozatriona a 3 diferentes concentraciones, en la Tabla XII se muestran los resultados obtenidos para las distintas concentraciones, y en la figura 13 se muestran las imágenes de la formulación obtenida a la concentración que mostró mejores resultados.

**Tabla XII:** Concentraciones de Rioloatriona probadas para el ungüento.

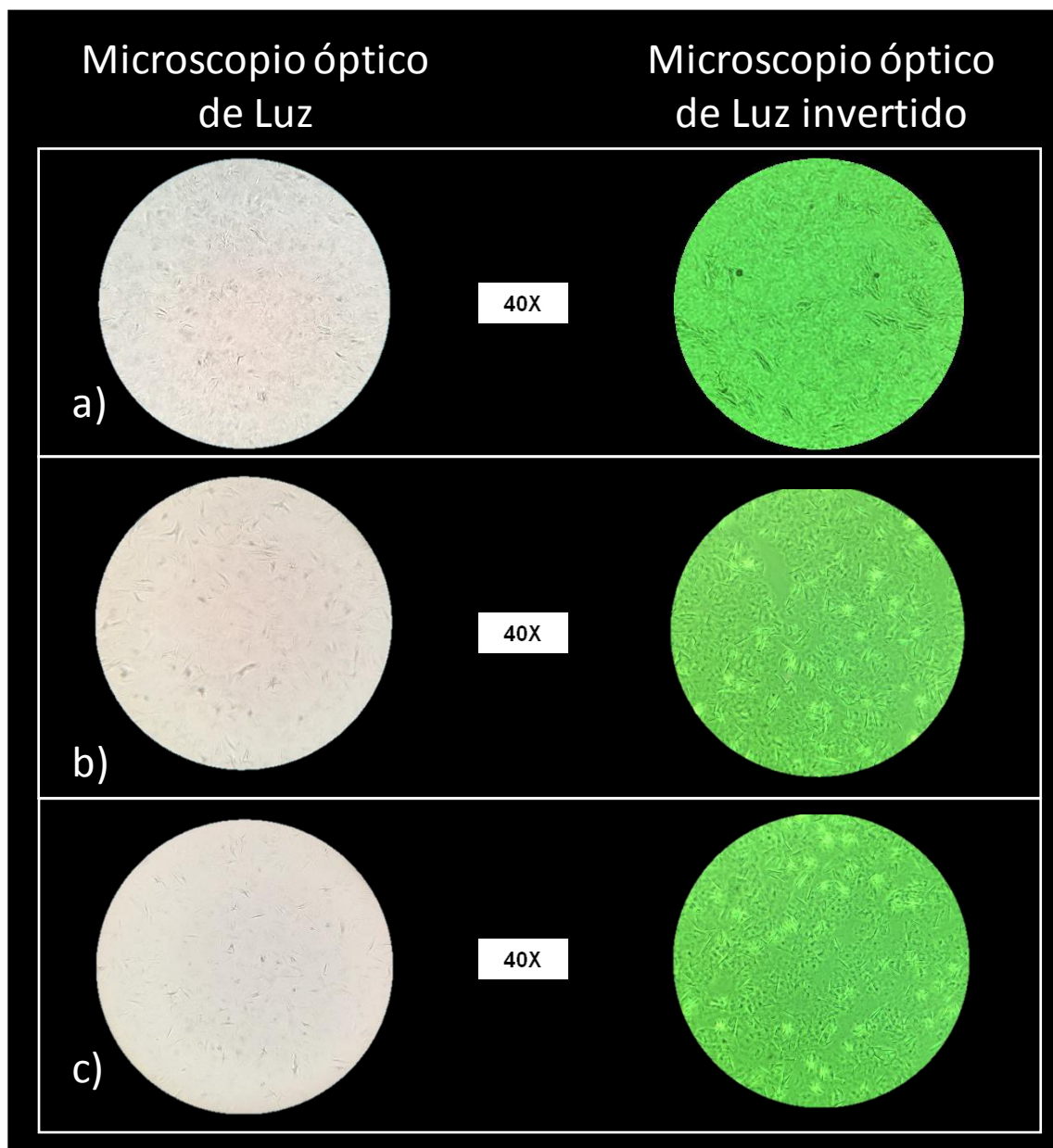
Concentración de Rioloatriona en el ungüento		
0.3%	0.5%	1%
La vaselina líquida fue capaz de solubilizar la cantidad de Rioloatriona probada.	La vaselina líquida no fue capaz de solubilizar la cantidad de Rioloatriona probada.	La vaselina líquida no fue capaz de solubilizar la cantidad de Rioloatriona probada.



**Figura 13.** Ungüento de Rioloatriona al 0.3% (p/p).

Los resultados de la inspección microscópica a 40X realizada al ungüento de Rioloatriona al 0.3% (p/p), a un blanco de ungüento y a la vaselina blanca empleada se muestran en la figura 14.





**Figura 14.** Micrografías a 40X en microscopio óptico de luz y microscopio óptico de luz invertido: **a)** Vaselina blanca comercial empleada; **b)** Blanco de ungüento; **c)** Ungüento de Riolozatriona al 0.3% (p/p).

### **3.3. Determinación de las características fisicoquímicas de las formulaciones desarrolladas.**

Se realizó la caracterización de la formulación oftálmica y el ungüento desarrolladas. Se emplearon tres lotes de cada formulación con Rioloatriona y un lote blanco y se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.2.5.

#### **3.3.1 Caracterización de la solución oftálmica de Rioloatriona (0.2% p/v).**

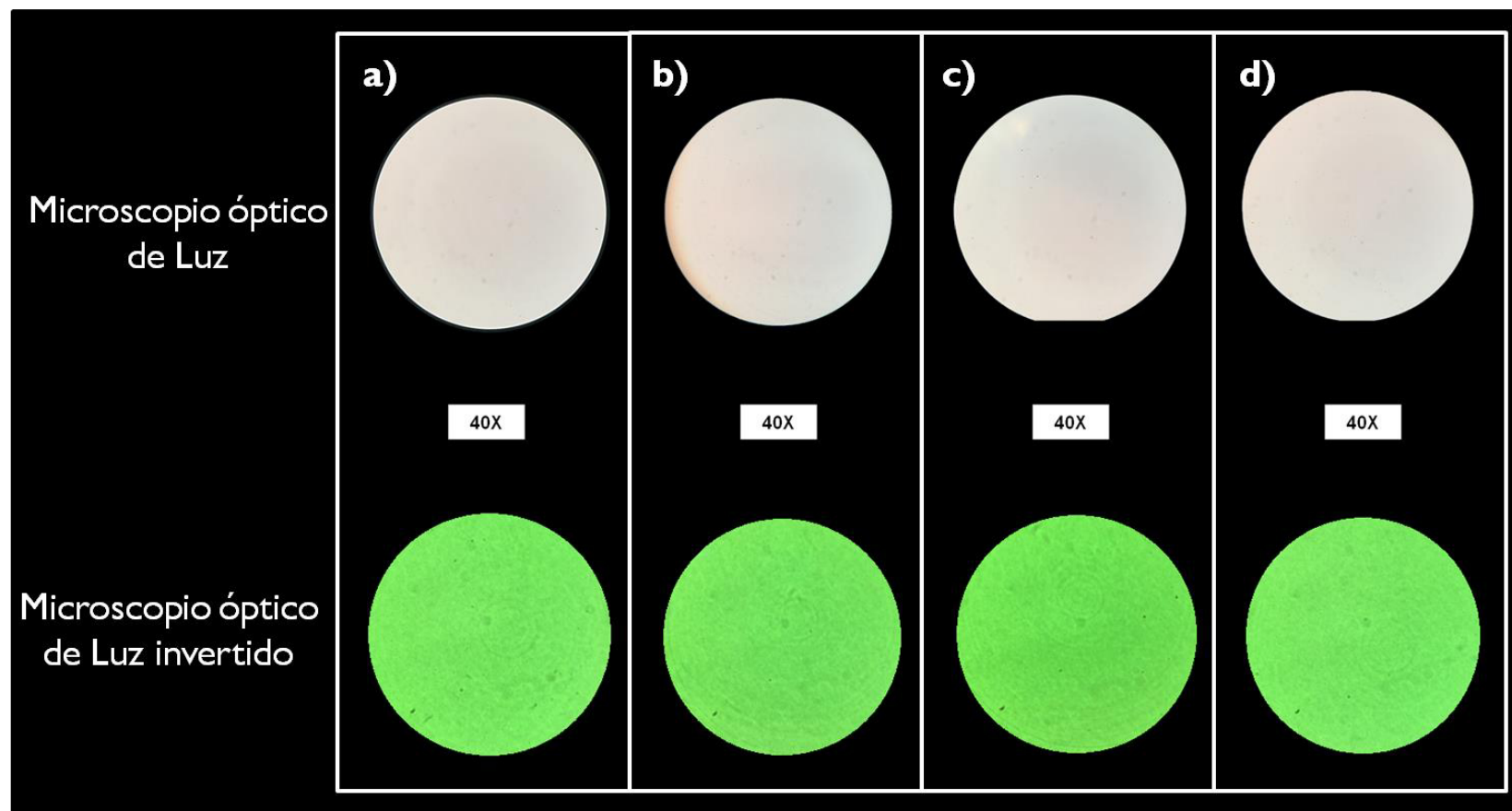
Se midieron las diferentes características fisicoquímicas a cada lote desarrollado de solución oftálmica, los resultados se muestran en la Tabla XIII. En la figura 15 se muestran las micrografías de los lotes de la solución oftálmica, en las cuales se analizó la homogeneidad.

La caracterización química se realizó mediante análisis en CCF y espectroscopía de RMN. Los resultados se muestran en las figuras 16, 17, 18 y 19.

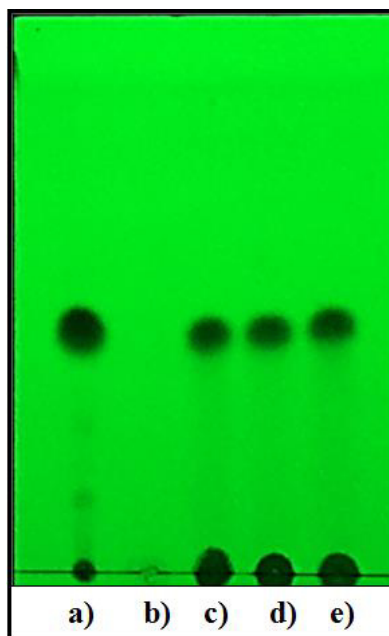
**Tabla XIII:** Características de la solución oftálmica de Riolozatriona al 0.2% (p/v).

Características	Solución Oftálmica				
	Blanco	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media $\pm$ DE
<b>Apariencia (Claridad, Color, Olor)</b>	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	<b>NA</b>
<b>pH</b>	5.83	5.64	5.84	5.91	<b>5.80 <math>\pm</math> 0.14</b>
<b>Viscosidad</b>	1.68 cP	1.67 cP	1.67 cP	1.65 cP	<b>1.66 <math>\pm</math> 0.01 cP</b>
<b>Homogeneidad</b>	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	<b>NA</b>
<b>Esterilidad</b>	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	<b>NA</b>

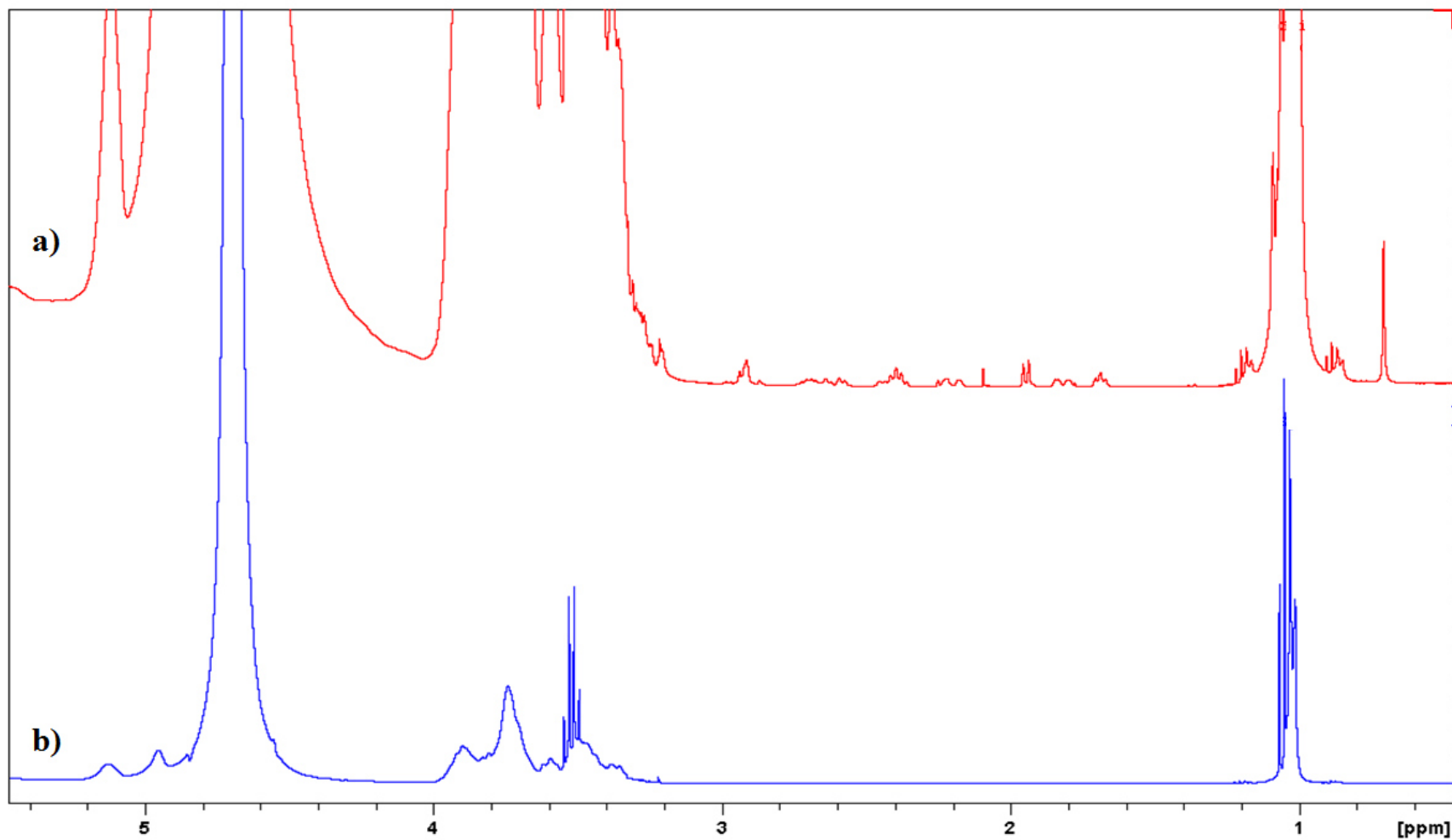
**NA:** No aplica



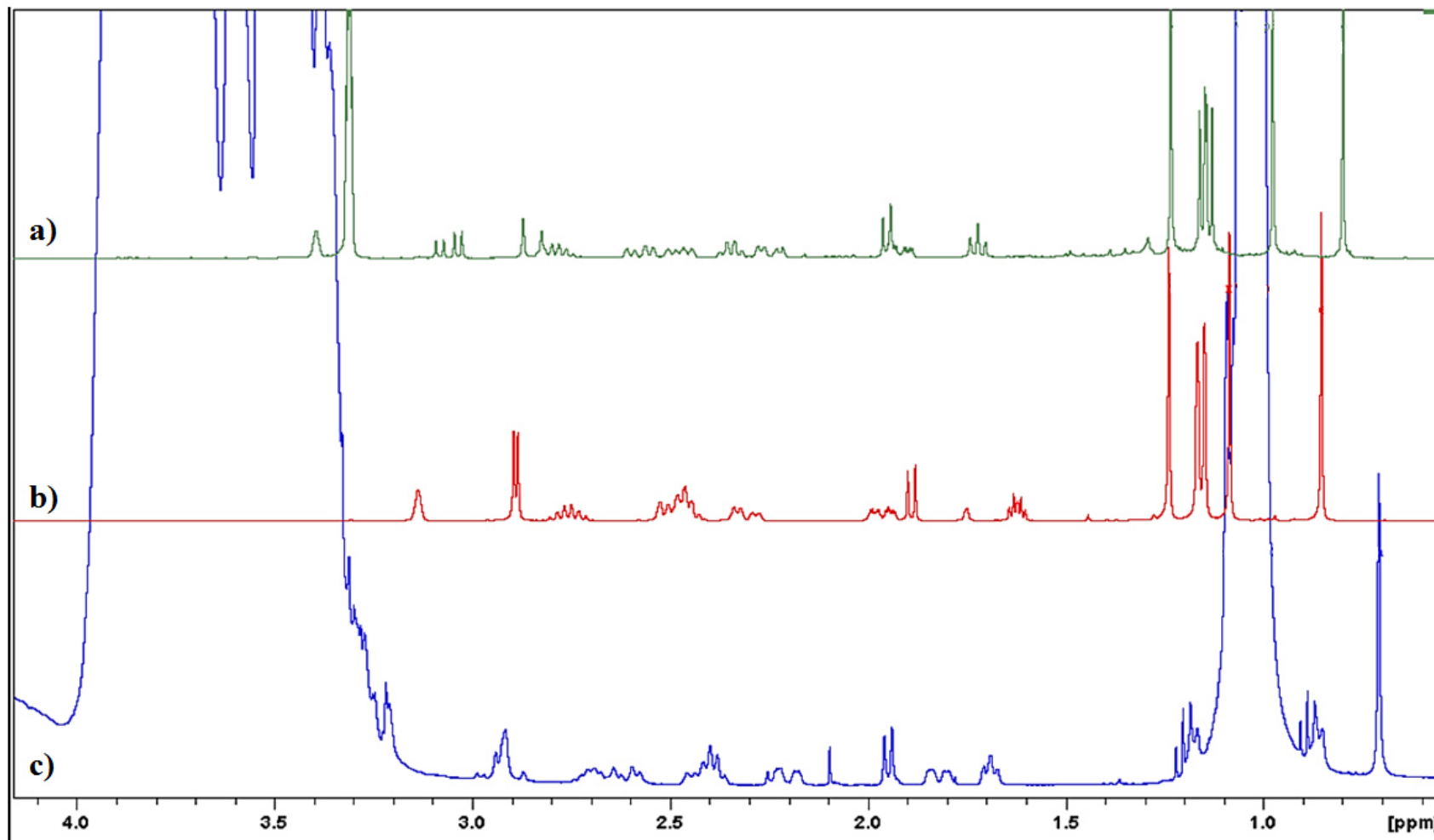
**Figura 15.** Micrografías de soluciones oftálmicas: **a)** Blanco de solución; **b)** Riolozatriona (0.2% p/v) Lote 1; **c)** Riolozatriona (0.2% p/v) Lote 2; **d)** Riolozatriona (0.2% p/v) Lote 3.



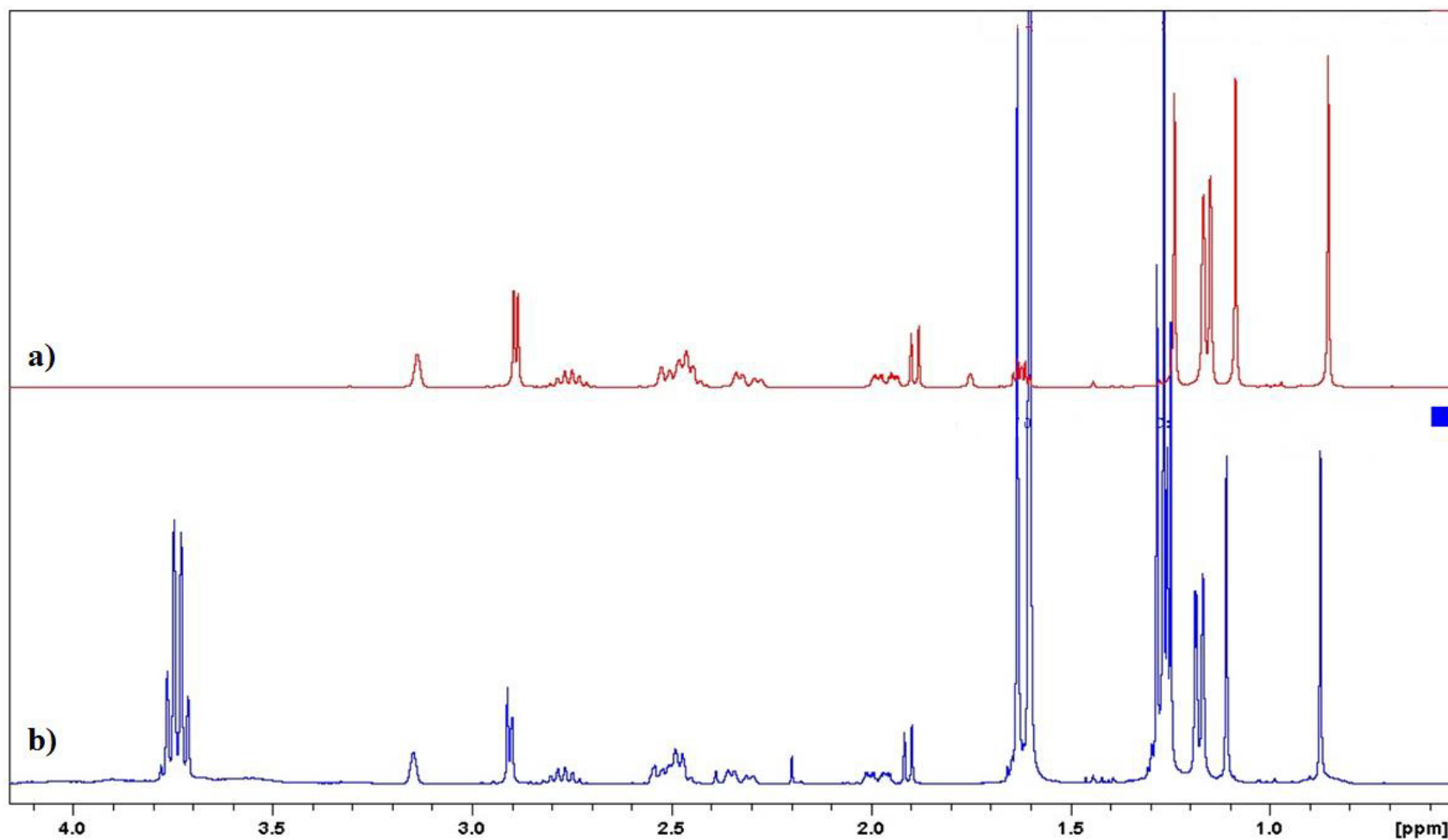
**Figura 16.** Cromatografía en Capa Fina de soluciones oftálmicas: **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Blanco de solución; **c)** Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 1; **d)** Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 2; **e)** Rioloatriona (0.2% p/v) Lote 3.



**Figura 17.** Espectros  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$ : Comparación de espectros de **a)** Solución de Riolozatriona (0.2% p/v); **b)** Blanco de solución.



**Figura 18.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN: Comparación de espectros de **a)** Rioloatriona de referencia en MeOD; **b)** Rioloatriona de referencia en  $\text{CDCl}_3$ ; **c)** Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) en  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 19.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ : Comparación de espectros de **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) extraída *in situ* con  $\text{CDCl}_3$ .



### 3.3.2. Caracterización del ungüento oftálmico de Riolozatriona (0.3% p/p).

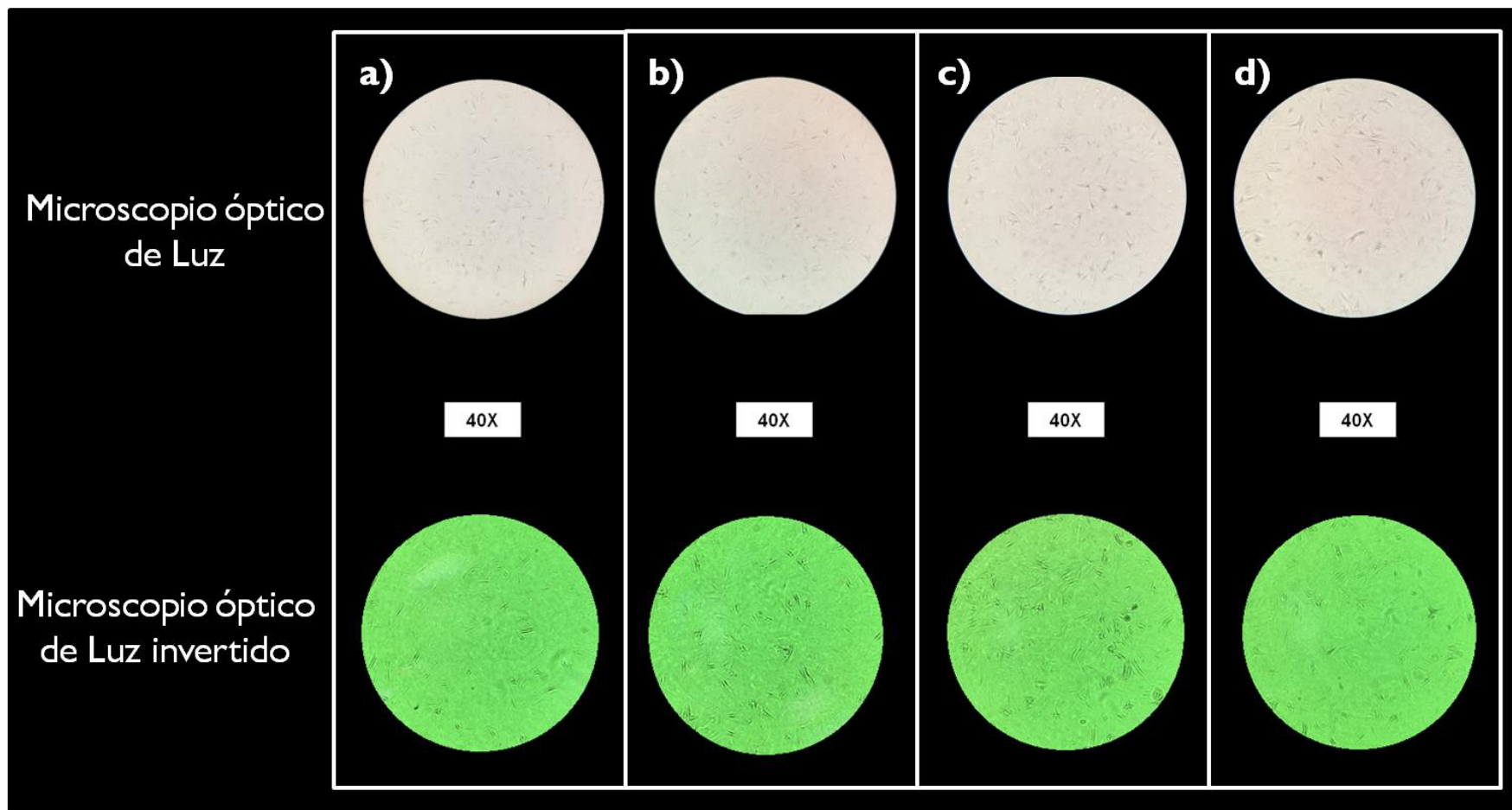
Se midieron las diferentes características físicas a cada lote desarrollado de ungüento oftálmico, los resultados se muestran en la Tabla XIV.

En la figura 20, se muestran las micrografías de los lotes del ungüento oftálmico, en las cuales se analizó la homogeneidad.

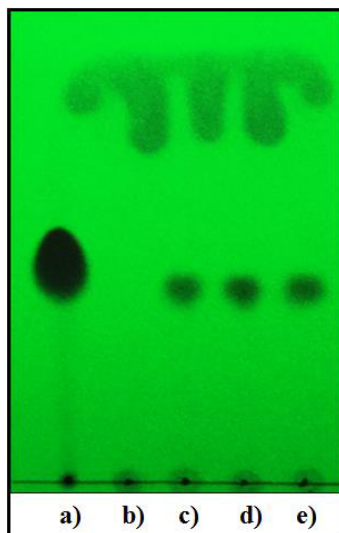
La caracterización química se realizó mediante análisis en CCF y espectroscopía de RMN. Los resultados se muestran en las figuras 21 y 22.

**Tabla XIV:** Características del ungüento oftálmico (0.3% p/p).

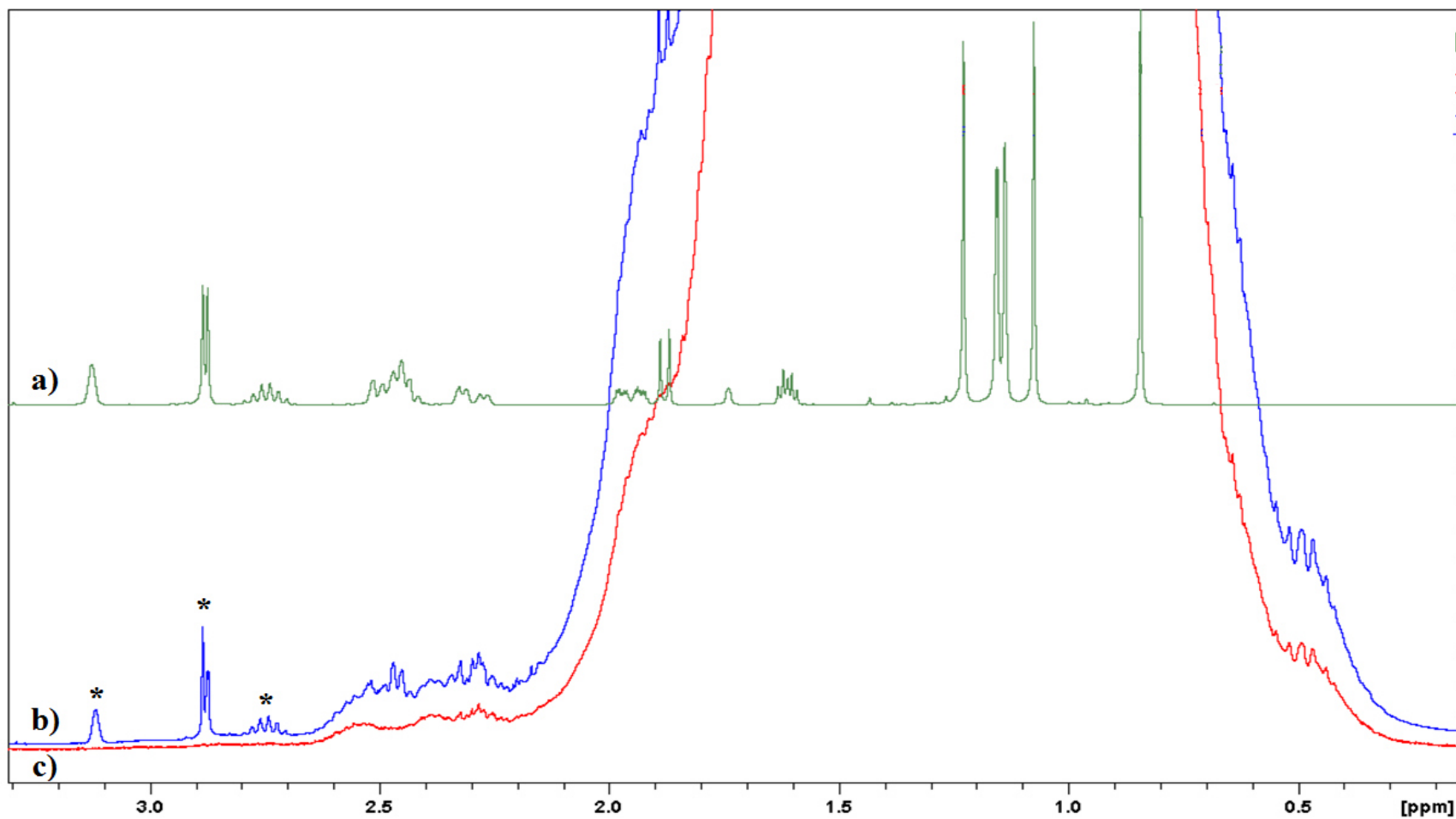
<b>Características</b>	<b>Ungüento oftálmico</b>			
	<b>Blanco</b>	<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Lote 3</b>
<b>Apariencia (Consistencia, Color, Olor)</b>	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos
<b>Homogeneidad</b>	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas	Ausencia de sólidos dispersos y partículas extrañas
<b>Esterilidad</b>	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.	Ausencia de crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.



**Figura 20.** Micrografías de ungüentos oftálmicos: **a)** Blanco de ungüento; **b)** Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 1; **c)** Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 2; **d)** Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 3.



**Figura 21.** Cromatografía en Capa Fina de ungüentos oftálmicos: **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Blanco de ungüento; **c)** Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 1; **d)** Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 2; **e)** Rioloatriona (0.3% p/p) Lote 3.



**Figura 22.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$ : Comparación de espectros de **a)** Rioloatriona de referencia; **b)** Ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p), señales atribuidas a la Rioloatriona (\*); **c)** Blanco de ungüento.

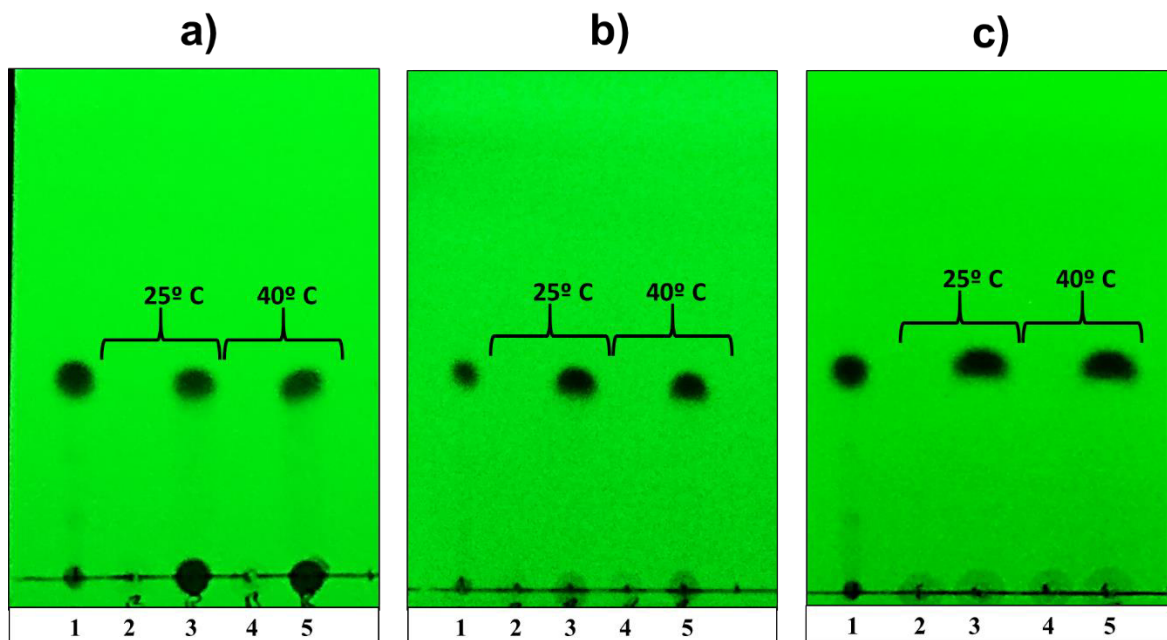
### 3.3.3 Estabilidad de las formulaciones desarrolladas.

En la Tabla XV se muestran las características físicas macroscópicas de la solución de Rioloatriona a temperatura ambiente y estabilidad acelerada.

**Tabla XV:** Características físicas de la solución de Rioloatriona.

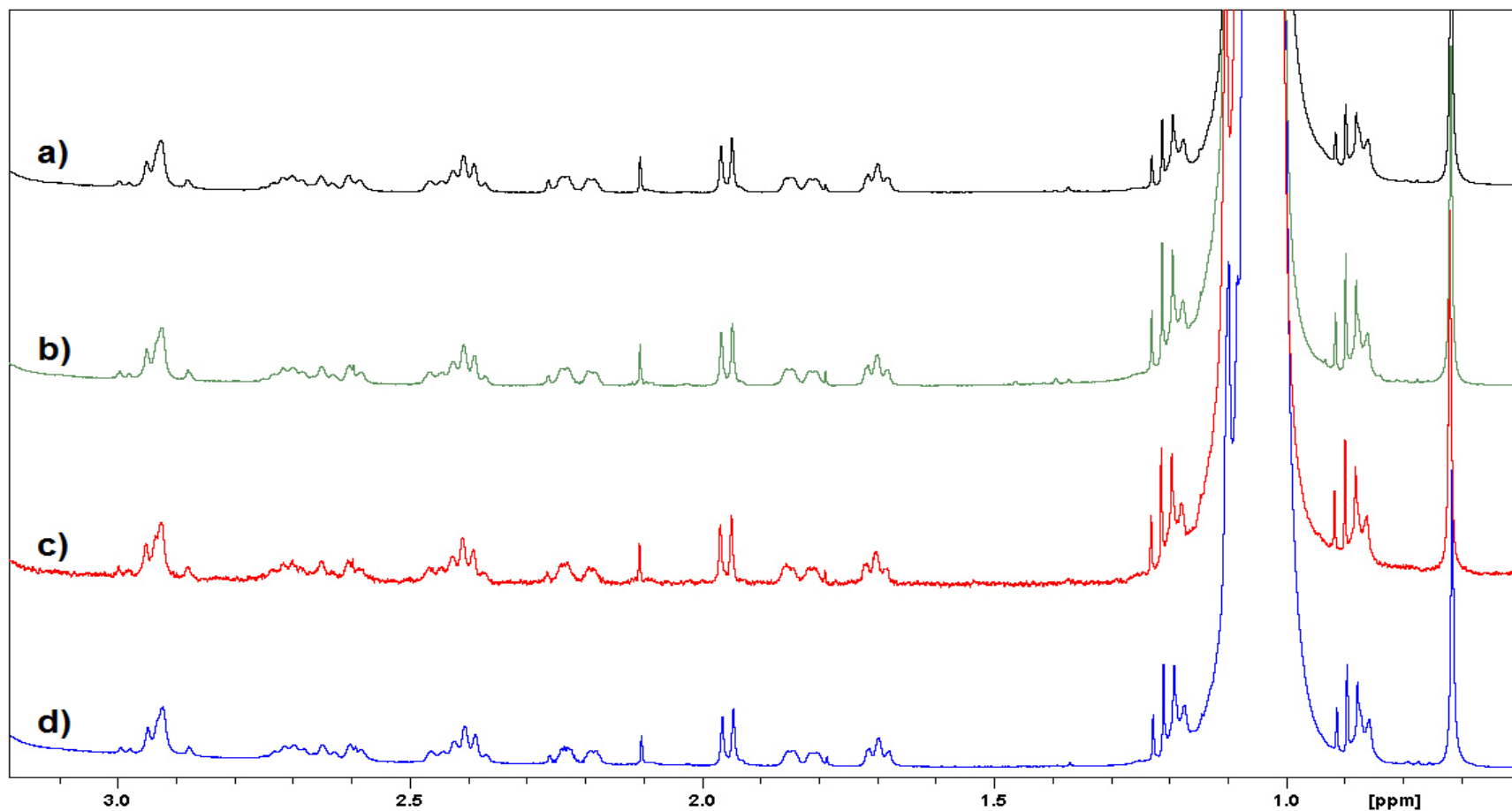
<b>Solución Rioloatriona (0.2% p/v)</b>			
	<b>30 días</b>	<b>60 días</b>	<b>90 días</b>
<b>ESTABILIDAD: Temperatura Ambiente (25 °C)</b>	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles
<b>ESTABILIDAD: Acelerada (40 ± 2°C, 70 ± 5% HR)</b>	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles	Transparente, incolora, libre de partículas visibles

En la figura 23 se muestra la CCF obtenida para las muestras de la solución de Rioloatriona (0.2% p/v) en condiciones de temperatura ambiente y estabilidad acelerada a los 30 días.



**Figura 23.** Cromatografía en Capa Fina de soluciones oftálmicas: **a)** Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a 30 días; **b)** Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a 60 días; **c)** Ungüento de Rioloatriona (0.2% p/v) a 90 días. (1-Rioloatriona de referencia; 2- Blanco de solución a temperatura ambiente; 3- Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a temperatura ambiente; 4- Blanco de solución a estabilidad acelerada; 5-Solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a estabilidad acelerada.)

En la figura 24 se presenta la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la solución de Rioloatriona (0.2% p/v) a los 0, 30, 60 y 90 días en condiciones de estabilidad acelerada realizados en  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Figura 24.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN en D<sub>2</sub>O: Comparación de espectros de **a)** Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 0 días; **b)** Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 30 días; **c)** Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 60 días; **d)** Solución Rioloatriona (0.2% p/v) a los 90 días; en condiciones de estabilidad acelerada.

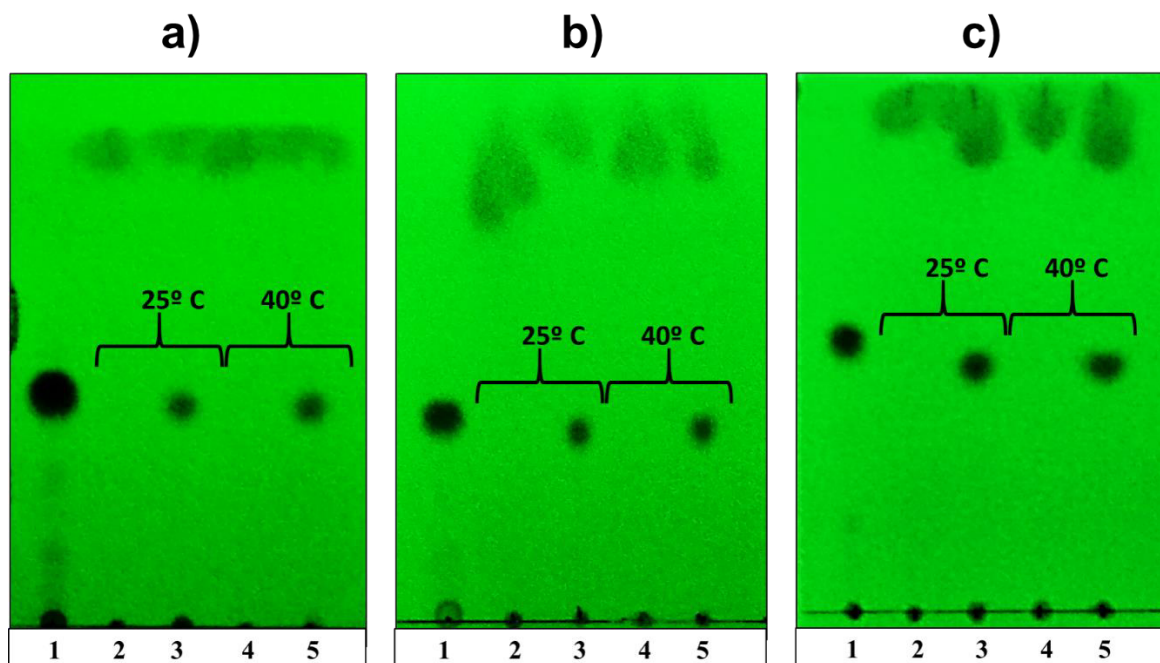
En la Tabla XVI se muestran las características físicas macroscópicas del ungüento de Rioloatriona a temperatura ambiente y estabilidad acelerada.

**Tabla XVI:** Características físicas del ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p)

<b>Ungüento Rioloatriona (0.3% p/p)</b>			
	<b>30 días</b>	<b>60 días</b>	<b>90 días</b>
<b>ESTABILIDAD: Temperatura Ambiente (25 °C)</b>	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos
<b>ESTABILIDAD: Acelerada (40 ± 2°C, 70 ± 5% HR)</b>	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos	Blando, blanco, olor característico, libre de gránulos

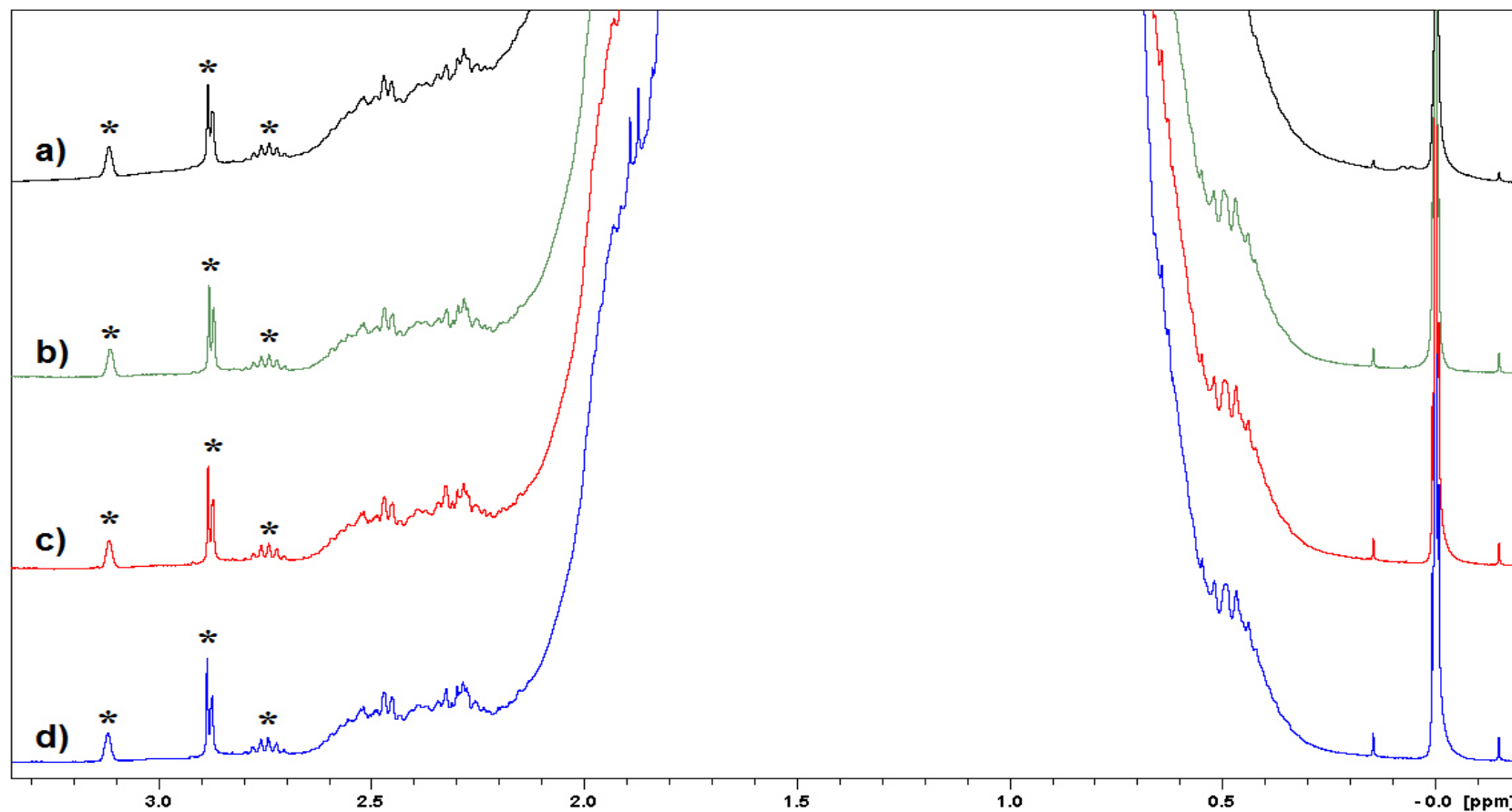
En la figura 25 se muestra la CCF obtenida para las muestras del ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) en condiciones de temperatura ambiente y estabilidad acelerada a los 30 días.





**Figura 25.** Cromatografía en Capa Fina de ungüentos oftálmicos: **a)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a 30 días; **b)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a 60 días; **c)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a 90 días. (1-Riolozatriona de referencia; 2- Blanco de ungüento a temperatura ambiente; 3-Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a temperatura ambiente; 4- Blanco de ungüento a estabilidad acelerada; 5-Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a estabilidad acelerada.)

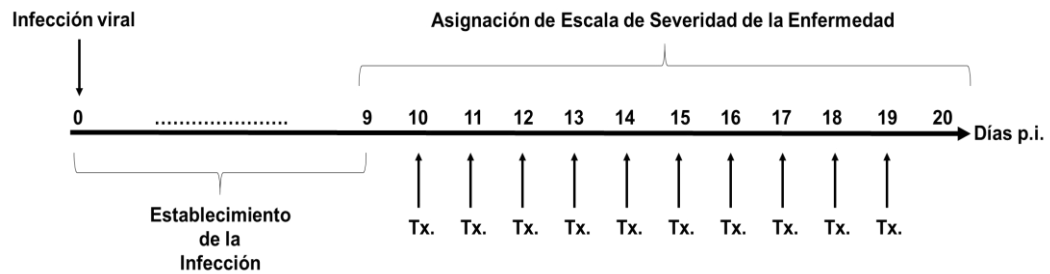
En la figura 26 se presenta la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a los 0, 30, 60 y 90 días en condiciones de estabilidad acelerada realizados en  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 26.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$ : Comparación de espectros de **a)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a los 0 días; **b)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a los 30 días; **c)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a los 60 días; **d)** Ungüento de Riolozatriona (0.3% p/p) a los 90 días; en condiciones de estabilidad acelerada.

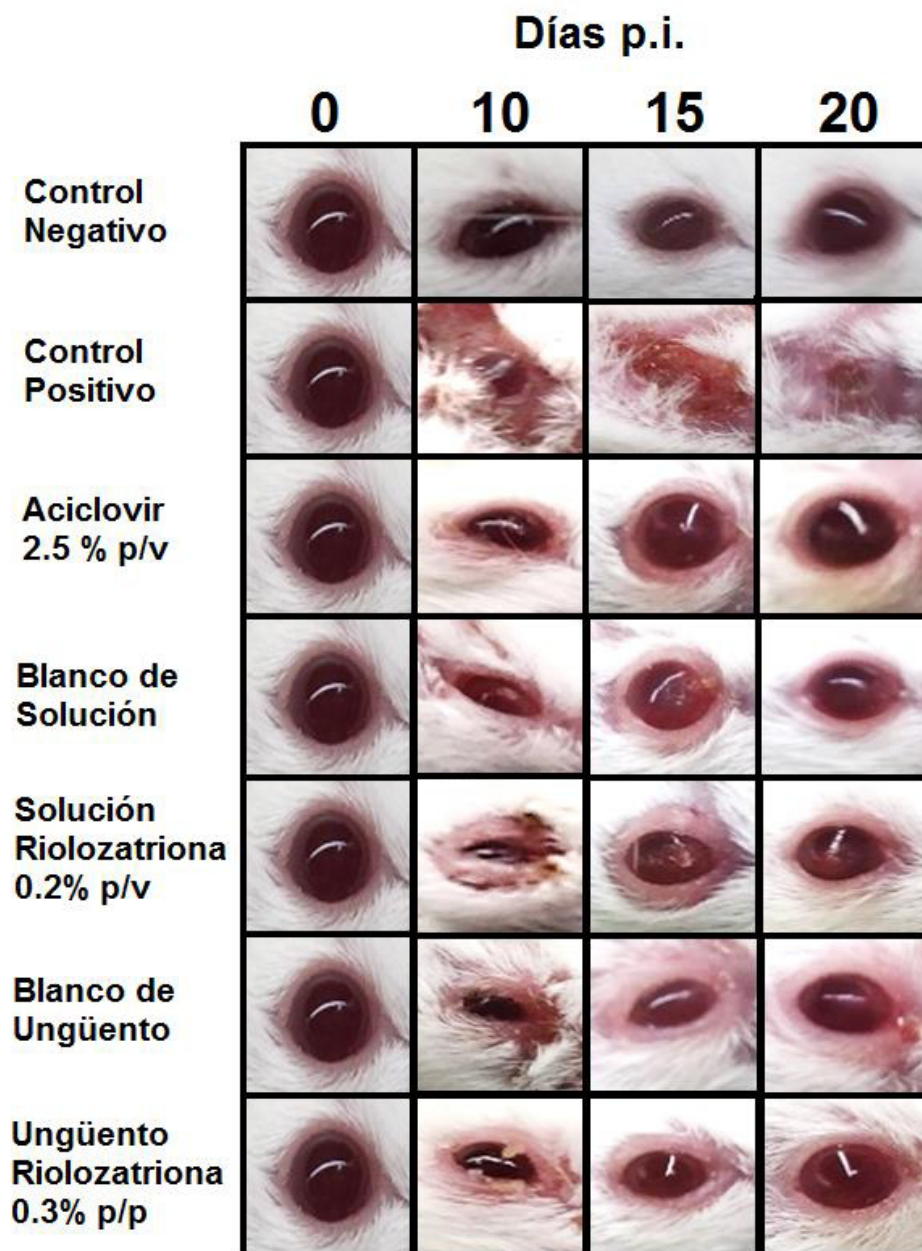
### 3.4. Evaluación de la actividad *in vivo* contra VHS-1 de las formulaciones desarrolladas, en un modelo experimental murino.

En la figura 27 se muestra el esquema de infección y tratamiento que se llevó a cabo para el desarrollo del modelo murino y evaluación de las formulaciones.



**Figura 27.** Esquema de infección y tratamiento en el modelo murino de Queratoconjuntivitis Herpética por VHS-1. **p.i.:** post-infección; **Tx:** Tratamiento.

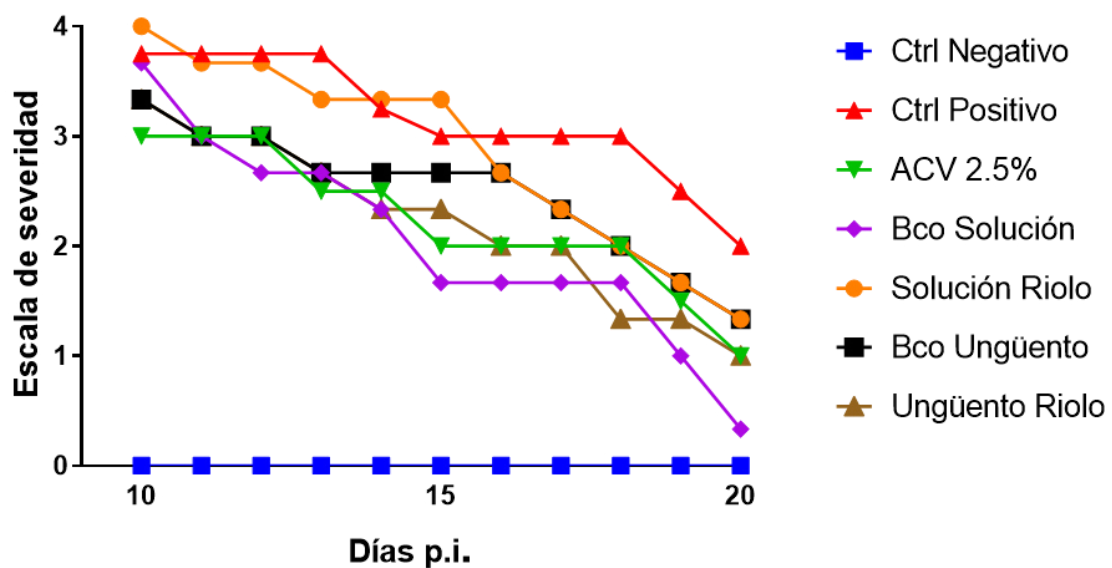
En la figura 28 se muestran las fotografías representativas de la evaluación de ojos de ratones de cada grupo durante la aplicación de los distintos tratamientos a los 0, 10, 15 y 20 días post-infección.



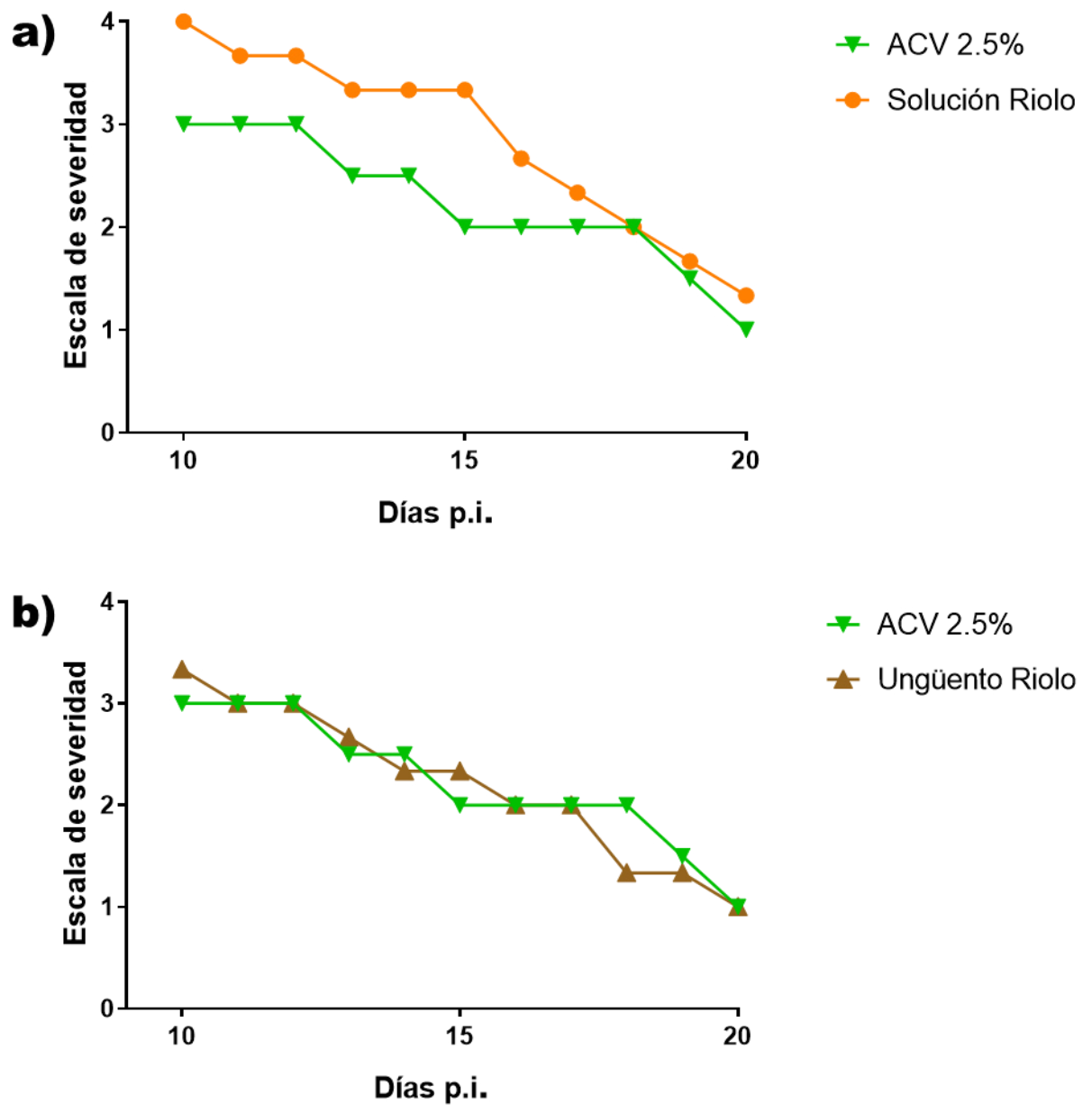
**Figura 28.** Evolución de la infección herpética ocular en ratones Balb/c y evidencia del efecto del tratamiento según la formulación aplicada a cada grupo de ratones, como se indica a la izquierda de la figura.

En la figura 29 se muestra la gráfica de los promedios de puntuaciones de severidad para cada grupo de estudio en el cual se hace una comparación de cada uno de ellos. Además, en la figura 30 se muestran dos graficas en donde

se compara la solución de Riolozatriona y el ungüento de Riolozatriona contra el control positivo de actividad anti herpética (Aciclovir al 2.5% p/v).



**Figura 29.** Reducción de la diseminación y severidad viral en base a los criterios clínicos establecidos. Los códigos de los grupos de ratones tratados y no tratados se muestran a la derecha de la gráfica.

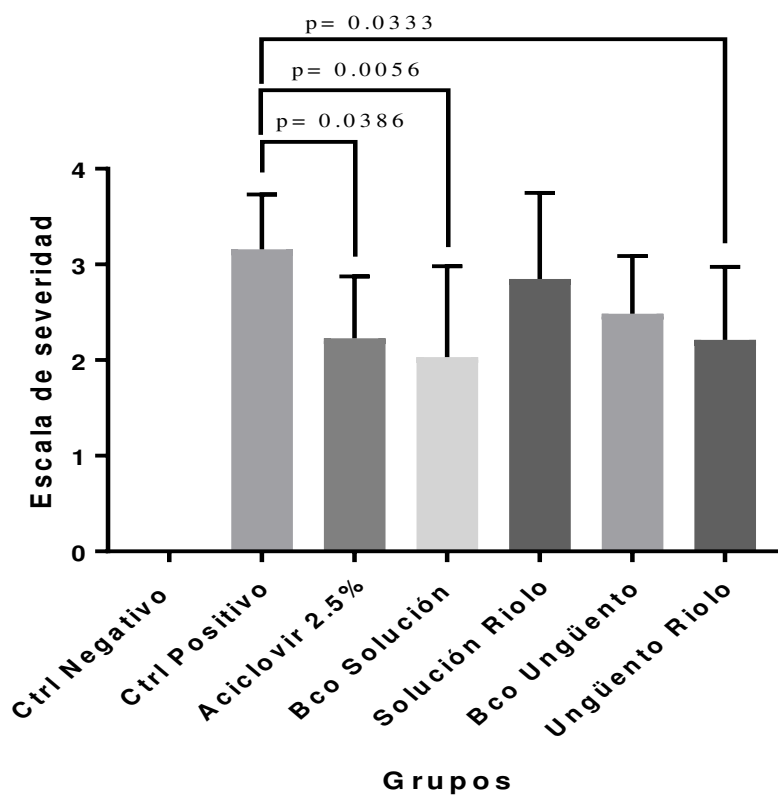


**Figura 30.** Reducción de la diseminación y severidad viral en base a los criterios clínicos establecidos y la comparación de los efectos de las formulaciones utilizadas en este estudio: **a)** Aciclovir 2.5% (p/v), contra Solución de Riolozatriona. y **b)** Aciclovir 2.5% (p/v), contra Ungüento de Riolozatriona

### 3.5. Análisis Estadístico

**Tabla XVII:** Valor p resultante del análisis ANOVA de un factor aplicado a los datos obtenidos.

ANOVA	
F	23,61
Valor P	<0,0001
Valor P resumen	****
Diferencia significativa entre medias ( $P < 0.05$ )?	Sí
R cuadrada	0,6693



**Figura 31:** Histograma de las medias de puntuaciones con los valores p resultantes ( $p < 0.05$ ) de la comparación múltiple de Tukey de los grupos de ratones.

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo se planteó el desarrollo de al menos una formulación a base de Rioloatriona, con la finalidad de evaluar la actividad anti-herpética de la misma en un modelo murino de queratoconjuntivitis herpética. En base al antecedente de la actividad anti-herpética *in vitro* reportado por Silva-Mares y cols. en el año del 2013, era importante realizar estudios de la actividad biológica antes mencionada en un modelo *in vivo*. (21) Para su buen desarrollo, fue necesario obtener en forma pura una cantidad suficiente de Rioloatriona para asegurar al menos una formulación que se pudiera utilizar en el modelo murino de queratoconjuntivitis herpética. Una vez obtenido el compuesto a evaluar, el reto fue seleccionar las formulaciones de Rioloatriona que experimentalmente fueran posibles preparar debido a la naturaleza química de este compuesto. Finalmente, las formulaciones se caracterizaron y se aplicaron en los ensayos biológicos para evaluar la actividad antiviral contra VHS-1 *in vivo* en el modelo murino antes mencionado.



#### 4.1. Obtención de Rioloatriona pura.

La obtención de Rioloatriona se llevó a cabo mediante la metodología de purificación ya establecida en los laboratorios de extracción del departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL. El extracto de diclorometano obtenido de la raíz molida y seca de *J. dioica*, fue sometido a separación por diversas columnas cromatográficas a baja presión, tanto de gel de sílice como de fase inversa. Se obtuvieron 1.3 g de Rioloatriona en forma de cristales, con la cual se llevó a cabo un análisis de pureza a través de métodos cromatográficos (CCF y CLAR) y espectroscópicos (UV-Vis y RMN). En la CCF realizada a la Rioloatriona purificada y de referencia mostrada en la figura 6, se observan 2 manchas con el mismo  $R_f$  correspondientes a la Rioloatriona, de igual manera al no observarse otras manchas en el cromatofolio nos indica que no hay presencia de otro tipo de compuestos. Además, en los cromatogramas obtenidos por CLAR mostrados en la figura 7, se observa un solo pico cromatográfico en cada uno de los cromatogramas con un tiempo de retención de 21 minutos. El pico observado corresponde tanto a la Rioloatriona purificada como a la Rioloatriona de referencia, cabe mencionar que ambos presentan el mismo espectro de UV-Visible. De igual forma, en la figura 8 se muestra la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la Rioloatriona purificada con la Rioloatriona de referencia, en la cual se aprecia el mismo patrón de señales de Hidrógeno demostrando así que el compuesto purificado corresponde a Rioloatriona y se encuentra espectroscópicamente pura.

#### **4.2. Desarrollo de una formulación tópica a base de Rioloatriona.**

Previo al desarrollo de una formulación, es necesario realizar varias pruebas pre-formulación, entre las cuales se encuentran: estudios de estabilidad química y de solubilidad del compuesto en diversos vehículos farmacéuticos (Tabla V). En base a los resultados, se eligieron dos formulaciones de Rioloatriona: una solución al 0.2% (p/v) y un ungüento al 0.3% (p/p).

Existen distintas formas de esterilizar formulaciones farmacéuticas: mediante calor húmedo con el uso de autoclave, por radiación y mediante filtración por membrana. El método de radiación se descartó debido a que no se tenía el equipo necesario, además de que su uso implica más riesgos para el analista y, por último, porque puede causar una degradación del compuesto mediante la generación de radicales libres, lo cual no es deseable. En cuanto al método de filtración por membrana, se eligió como método para esterilizar la solución oftálmica debido a que tiene la ventaja de no degradar los compuestos. En el caso del ungüento se eligió el método de calor húmedo con el uso de autoclave.

Dada la necesidad de esterilizar el ungüento de Rioloatriona por autoclave, se estudió la estabilidad química de la Rioloatriona posterior a este proceso.

En la figura 9 se muestra la comparación del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la Rioloatriona después del proceso de autoclave (Rioloatriona-autoclave) con el

de la Rioloatriona de referencia. Se puede observar que el patrón de señales de la Rioloatriona-autoclave es el mismo que el de la Rioloatriona de referencia, a excepción de la señal deformada a 1.6 ppm. Dicha deformación se debe al solapamiento de las señales del Hidrógeno de la Rioloatriona y el Hidrógeno del agua, lo cual era de esperarse ya que el método de esterilización por autoclave emplea agua. Por lo tanto, se demostró que el método de calor húmedo puede ser usado para la esterilización del ungüento.

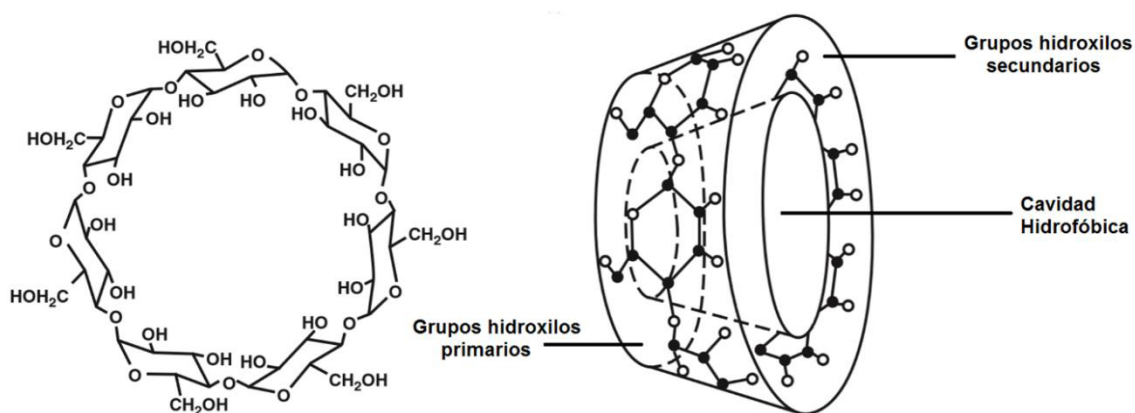
Con la finalidad de establecer los vehículos farmacéuticos adecuados para realizar las tres formulaciones (solución, suspensión y ungüento oftálmico), se realizaron pruebas de solubilidad en diferentes vehículos encontrados con frecuencia en productos oftálmicos comerciales. En la Tabla X se muestran los resultados de estas pruebas, donde se observó la solubilidad de la Rioloatriona en: miristato de isopropilo, propilenglicol, aceite de oliva y aceite mineral. Los primeros tres vehículos se podían emplear en la preparación de la solución oftálmica, mientras que el aceite mineral en la elaboración del ungüento oftálmico ya que es ingrediente común en este tipo de formulación. Cabe mencionar que los vehículos empleados no deben reaccionar con el activo ni dañar o causar irritación en el tejido ocular (49).

Lo más común y aceptable para el ojo es que aquellos activos que se administren en él, se encuentren en solución acuosa en base a la composición de las lágrimas

y la morfología del ojo. Por esta razón la preparación de la solución oftálmica representó un reto debido a que la Rioloatriona presenta características no polares. El uso de propilenglicol y/o aceite de oliva no es aceptado para el ojo en una proporción del 100 %, debido a que causan daños en el tejido ocular e irritación y hasta inclusive precipitación del activo al estar en contacto con el líquido lagrimal (26). Debido a lo anterior, surgió la necesidad de buscar vehículos aceptados para la administración oftálmica capaces de solubilizar a la Rioloatriona en un medio acuoso.

En la literatura se hace mención de un grupo de oligosacáridos cíclicos empleados como vehículos para diferentes vías de administración, entre ellas la administración oftálmica. Dichos oligosacáridos, conocidos como ciclodextrinas, favorecen la solubilidad del compuesto activo en un medio acuoso, favorecen su estabilidad, biodisponibilidad y además presentan baja toxicidad e irritabilidad local. (46-49)

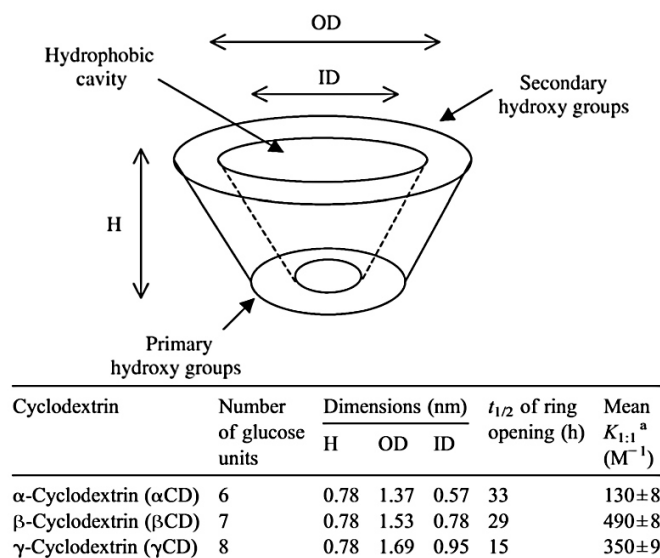
En la figura 32 se muestra la estructura típica de una ciclodextrina, la cual presenta forma cónica con una cavidad no polar y un exterior polar que la hace soluble en agua. (46)



**Figura 32.** Estructura química y conformación de Ciclodextrinas.

La forma en que las ciclodextrinas ayudan a la solubilidad del principio activo en agua, es mediante la formación de complejos de inclusión, en los cuales la ciclodextrina acepta en su cavidad central a la molécula del fármaco o compuesto activo, o más comúnmente, solo la parte lipofílica de la molécula. Mientras el complejo es formado, enlaces no covalentes se forman y se rompen, y las moléculas del fármaco o principio activo entran en un equilibrio rápido con las moléculas libres en la solución. El equilibrio inicial para formar complejos es rápido mientras que el equilibrio final lleva más tiempo en ocurrir. Una vez que las moléculas se encuentran dentro de la cavidad, éstas realizan un ajuste conformacional para aprovechar al máximo la presencia de las fuerzas débiles de Van der Waals. (46)

Jambhekar, S. y Breen, P. (46), en un artículo de revisión reportaron que, en base a las dimensiones de las ciclodextrinas, la  $\alpha$ -CD puede formar complejos con compuestos de bajo peso molecular o compuestos con cadenas alifáticas. En cambio, la beta ciclodextrina ( $\beta$ -CD) puede formar complejos con aromáticos y moléculas heterocíclicas y la gama ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) puede formar complejos con moléculas más grandes como macrociclos y esteroides (figura 33).



**Figura 33.** Características de las ciclodextrinas nativas.

Lallemand y cols. (25) realizaron un artículo de revisión en donde reportan el uso de la alfa ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) para aumentar la solubilidad de la Ciclosporina A (CsA) para su administración oftálmica, por lo que se decidió comenzar con esta ciclodextrina empleando distintas concentraciones a las reportadas por Kanai y cols. para la CsA (27).

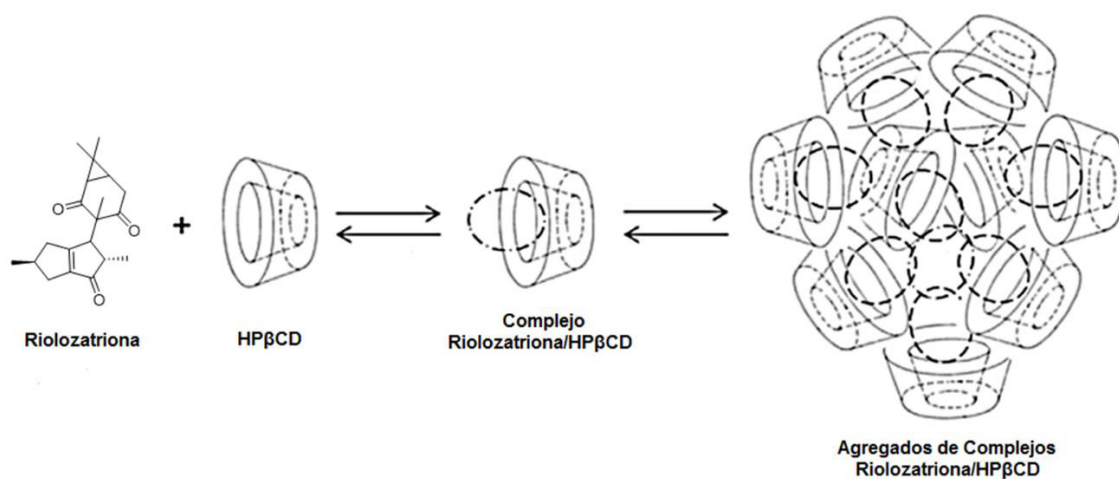
Se preparó una solución de  $\alpha$ -CD al 5% (p/v) y se incorporó la Rioloatriona al 0.05% (p/v) (figura 10a), sin embargo, al cabo de 24 hrs. se observó la presencia de precipitados por ser un sistema inestable (figura 10b). Con base a estos resultados se puede deducir que la Rioloatriona no llegó a formar un complejo con la  $\alpha$ -CD, probablemente a que el tamaño de la cavidad de la  $\alpha$ -CD no es lo suficientemente grande para el tamaño y/o forma tridimensional de la molécula de la Rioloatriona.

Debido a lo anterior se decidió probar con 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP $\beta$ CD), un derivado de la  $\beta$ -CD, de la cual se sabía que era de mayor diámetro de cavidad que la  $\alpha$ -CD. Además, esta ciclodextrina presenta mayor solubilidad y menor toxicidad que la ciclodextrina nativa ( $\beta$ -CD), pero con el mismo diámetro de cavidad.

La concentración que se eligió de la HP $\beta$ CD fue una concentración intermedia con base en las patentes de formulaciones oftálmicas de otros fármacos que existen, así como en las soluciones oftálmicas comerciales que la contienen como vehículo.

Se probaron concentraciones distintas de Rioloatriona manteniendo la concentración de HP $\beta$ CD de 15% (p/v). En la Tabla XI se pueden observar los resultados obtenidos, en donde la máxima concentración de Rioloatriona

solubilizada fue de 0.2% (p/v). La solución recién obtenida se muestra en la figura 11, así como la solución después de 30 días. Esto indica que la formulación es estable y se propone la formación de complejos HP $\beta$ CD/Rioloatriona. Los complejos formados más comunes son aquellos que tienen una relación molar CD/compuesto activo de 1:1. Con respecto a la Rioloatriona, es necesario llevar a cabo un estudio de cinética de formación de complejo HP $\beta$ CD/Rioloatriona, para establecer la relación molar que existe entre ambos. Sin embargo, debido a las proporciones de HP $\beta$ CD con respecto a la Rioloatriona, es posible que la Rioloatriona aparentemente es acomplejada por varias moléculas de ciclodextrina, de manera que se formen agregados como se muestra en la figura 34.



**Figura 34.** Forma hipotética de los complejos Rioloatriona/HP $\beta$ CD formados en la solución oftálmica.

Otra formulación que se planteó realizar fue la suspensión oftálmica. Este tipo de formulación debe presentar ciertas características similares a las soluciones



oftálmicas como la isotonicidad, pH adecuado, viscosidad adecuada, entre otras. Las suspensiones son dispersiones de fármacos relativamente insolubles y finamente divididos en vehículos acuosos con agentes suspensores y dispersantes adecuados, además debe cumplir con las características como un tamaño de partícula menor a 10  $\mu\text{m}$  para no causar irritación, así como una uniformidad y suspendibilidad del principio activo. (50)

Se realizó una suspensión de Rioloatriona con algunos de los vehículos probados (Tabla X) y que han sido empleados para la preparación de suspensiones oftálmicas en la industria farmacéutica, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.2.4.5. En la figura 12 se puede observar el aspecto de la suspensión obtenida y los resultados fueron no favorables, debido a que no cumplen con las características adecuadas descritas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Entre las características que se incumplieron se encuentran: la uniformidad de las partículas presentes de Rioloatriona, el tamaño de partícula (mayor a 10  $\mu\text{m}$ ), y microscópicamente se pudo observar presencia de cristales de Rioloatriona, algo que no está permitido en una suspensión oftálmica ya que puede causar daños e irritación en el ojo. Por todo lo anterior la suspensión oftálmica de Rioloatriona desarrollada, no se aceptó para ser aplicada en el modelo murino *in vivo*.

La tercera formulación de Rioloatriona que se desarrolló fue un ungüento oftálmico. Los ungüentos son comúnmente usados para aplicaciones de fármacos de manera tópica en el ojo. Los vehículos son principalmente mezclas de vaselina blanca generalmente en una proporción del 60%, aceite mineral en una proporción del 40%, y puede o no llevar un agente miscible en agua como la lanolina. El aceite mineral se agrega con el fin de que el vehículo se derrita a la temperatura corporal, mientras que la lanolina se agrega para que absorba agua. (49).

Se probaron distintas concentraciones de Rioloatriona en la vaselina líquida, con el fin de establecer la máxima concentración de Rioloatriona que podía ser solubilizada. En la Tabla XII se pueden observar los resultados obtenidos, en donde la concentración de Rioloatriona fue de 0.3% (p/p). Posterior a esto se preparó el ungüento oftálmico y el aspecto físico se muestra en la figura 13. Además, se realizó una inspección microscópica a 40X para asegurar que no hubiera presencia de agregados o partículas extrañas, así como también ver morfología del ungüento (figura 14) y se pudo observar que no hay presencia de agregados, partículas extrañas ni cristales de Rioloatriona. Es importante mencionar que la morfología que presenta el ungüento en forma de “astillas”, es la morfología propia de la Vaselina blanca empleada. Por lo tanto, se pudo realizar un ungüento oftálmico de Rioloatriona a una concentración de 0.3% (p/p).

### **4.3. Caracterización fisicoquímica de las formulaciones desarrolladas.**

Para llevar a cabo la caracterización de las dos formulaciones de Rioloatriona desarrolladas, fue necesario preparar formulaciones “blanco” de cada una, es decir, que contienen todos los ingredientes a excepción de Rioloatriona. De cada formulación de Rioloatriona (solución y ungüento oftálmico) se prepararon tres lotes.

Con respecto a la formulación de solución oftálmica de HP $\beta$ CD con Rioloatriona y al blanco de la solución, los resultados de la caracterización fueron favorables para una solución oftálmica según lo descrito en la FEUM (Tabla XIII). (52) El aspecto, la homogeneidad y la esterilidad fueron las características más favorables.

La homogeneidad de la formulación de Rioloatriona en solución fue analizada por microscopia de luz y en las imágenes de micrografía que se muestran en la figura 15, no se observan partículas extrañas ni presencia de sólidos dispersos, asegurando así la homogeneidad de la solución. El ensayo de esterilidad fue realizado en el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., por la Q.C.B. Alma Delia López Medrano. Todos los lotes fueron sembrados en una batería de variados medios de cultivos que abarcan un amplio

rango de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) con el fin de verificar que las soluciones estuvieran libres de cualquiera de éstos. Entre los medios utilizados se incluyen el Caldo Tioglicolato y el Agar Tripticasa de Soya, medios que dicta la FEUM para los ensayos de esterilidad. El reporte expedido por el laboratorio de microbiología se muestra en el ANEXO A, donde se puede constatar que todos los lotes fueron “Negativos” para crecimiento de microorganismos lo que asegura la esterilidad de la formulación.

Con respecto al pH de la formulación en solución, estuvo cercano al rango óptimo (pH de 6 a 8), con un promedio de pH de 5.8, lo cual sugiere que es adecuado. En cuanto a la viscosidad, fue la única característica no favorable, ya que se recomienda que la solución oftálmica tenga una viscosidad de 15 a 20 centipoises (cP) para de este modo aumentar el tiempo de contacto del fármaco en el ojo. Sin embargo, esta característica se puede modificar con la adición agentes viscosantes, como la hidroxipropilmetilcelulosa, polivinil alcohol, entre otros; por lo que no se descartó esta formulación para los ensayos *in vivo*.

En cuanto a la caracterización química de la formulación de solución oftálmica de HP $\beta$ CD con Rioloatriona, ésta se realizó mediante RMN y CCF. En la figura 16 se muestra la CCF de los lotes, y se pueden observar las manchas con el mismo R<sub>f</sub> que la Rioloatriona de referencia en las soluciones que la contienen. En la solución blanco se muestra una mancha tenue en el punto de siembra la cual

corresponde a la ciclodextrina. La mancha que se observa en el punto de siembra de los lotes de la solución de Rioloatriona se debe probablemente a parte de la Rioloatriona que se encuentra acomplejada con la ciclodextrina.

En la figura 17 se muestra la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  de la formulación en solución de Rioloatriona (0.2% p/v) con el espectro de un blanco de solución. En el espectro de la solución se pueden observar señales que no se encuentran en el blanco, lo cual indica que la Rioloatriona se encuentra presente en ésta. En la figura 18 se muestra la comparación de los patrones de señales de  $^1\text{H}$ -RMN de la Rioloatriona en distintos disolventes deuterados con el patrón de señales de la formulación en solución de Rioloatriona en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se pueden observar algunas similitudes en las señales, sin embargo, estas cambian debido al disolvente en el que se encuentran. Debido a ello se decidió realizar una extracción de la Rioloatriona *in situ* con  $\text{CDCl}_3$  con el fin de hacer más evidente esta comparación de las señales. El espectro obtenido de la extracción se comparó con el espectro de la Rioloatriona en este disolvente (figura 19), con este experimento se pudo asegurar la presencia de la Rioloatriona en la solución y además no se observó ningún cambio químico aparente en la molécula. De esta manera se pudo realizar la caracterización fisicoquímica de la solución oftálmica.

Con respecto a la formulación de Rioloatriona en ungüento oftálmico, se determinaron las características fisicoquímicas del blanco de ungüento, así como de cada lote de ungüento de Rioloatriona preparado. En la Tabla XIV se muestra que los resultados de estas características fueron favorables para el ungüento oftálmico según lo descrito en la FEUM. En el caso del ungüento oftálmico las características más importantes con las que debe de cumplir son tres: la ausencia de partículas extrañas, la esterilidad y, en caso de contener el principio activo micronizado, este debe tener un tamaño de partícula menor a 10  $\mu\text{m}$ ; en nuestro caso solo se requerían 2 de estas características y ambas fueron cumplidas al 100%.

El ensayo de esterilidad de esta nueva formulación, como ya se mencionó anteriormente, fue realizado en el Departamento de Microbiología y el reporte emitido por el mismo se muestra en el ANEXO A, donde se demuestra la esterilidad de los lotes del ungüento. En el caso de la homogeneidad las micrografías obtenidas se muestran en la figura 20 donde se muestran los lotes del ungüento y se observa la forma en “astillas” característica de la vaselina anteriormente mencionada en la *sección 4.2.5*, así como también se demostró la ausencia de partículas extrañas y sólidos dispersos.

La caracterización química de la formulación de Rioloatriona en ungüento se realizó mediante RMN y CCF. En la figura 21 se muestra la CCF de los lotes, y

en ella se pueden observar las manchas con el mismo R<sub>f</sub> de la Rioloatriona en los lotes de ungüento que la contienen. En el lote blanco se muestra una mancha en el frente del solvente, la cual corresponde a la vaselina, en este caso el vehículo farmacéutico empleado. En la figura 22 se muestra la comparación de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN en CDCl<sub>3</sub> de la Rioloatriona de referencia, el ungüento de Rioloatriona (0.3% p/p) y del ungüento blanco, se pueden observar un conjunto de señales solapadas en la zona de protones alifáticos (0.4 a 2.6 ppm) los cuales corresponden a los protones de los hidrocarburos presentes en la vaselina, ya que estas señales están presentes tanto en el blanco como en el ungüento de Rioloatriona.

En cuanto a las señales de Rioloatriona presentes en el ungüento se pueden observar 3 de ellas en el rango de 2.7 a 3.2 ppm, estas señales coinciden con las de la Rioloatriona de referencia y tanto la partición como el desplazamiento químico de estas coincide, lo cual es suficiente para realizar la caracterización química y de esta manera demostrar que la Rioloatriona está presente en el ungüento y no tiene ningún cambio químico aparente.

#### **4. 4. Estabilidad de las formulaciones desarrolladas**

Ambas formulaciones de Rioloatriona desarrolladas presentaron estabilidad física y química al menos durante 3 meses. Esto se comprobó con la observación

macroscópica mensual para la estabilidad física (Tabla XV y Tabla XVI) mientras que para la estabilidad química se utilizó el análisis por CCF y  $^1\text{H}$ -RMN.

Para la solución de Riolozatriona (0.2% p/v) se obtuvieron las CCF a los 30, 60 y 90 días (figura 23) y en ninguna de ellas se observan manchas diferentes a la Riolozatriona, que indiquen productos de degradación, así como también se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 24) en donde se observa el mismo patrón de señales a los 0, 30, 60 y 90 días demostrando la ausencia de algún cambio químico, por lo tanto, se demostró que es químicamente estable. Para el ungüento de Riolozatriona se obtuvieron resultados similares, en la CCF no se observan productos de degradación (figura 25) y en el  $^1\text{H}$ -RMN (figura 26) se observa el mismo patrón de señales sin cambios químicos aparentes, por lo que se demostró la estabilidad física y química del ungüento.

#### **4.5. Evaluación de la actividad *in vivo* contra VHS-1 de las formulaciones desarrolladas.**

El modelo de queratoconjuntivitis herpética se desarrolló de acuerdo al trabajo reportado por Morrison y Knipe en 1994 (44). Se inocularon los ojos de los ratones Balb/c con un concentrado viral de VHS-1, y la aplicación del tratamiento se inició a partir del día 10 post-infección (pi).



En base a nuestros resultados observamos una disminución de la diseminación y severidad de la infección viral ocular, con tres de nuestras formulaciones aplicadas: Aciclovir al 2.5 % (p/v), blanco de solución (solo HP $\beta$ CD al 15% p/v) y el ungüento de Rioloatriona. Este efecto se observó durante el periodo de tiempo en el que se aplicó diariamente el tratamiento en los ojos de los ratones evaluados. En la figura 28 se muestran imágenes representativas de este efecto, y se observa como disminuye el daño corneal causado por la infección herpética, en los ratones tratados con las tres formulaciones antes mencionadas. De la misma manera, este efecto se observa en la figura 29, representado como una gráfica de los promedios de las puntuaciones de severidad asignados a cada grupo de ratones, en función del tiempo.

En la figura 30, muestra la reducción de la diseminación y severidad viral en base a los criterios clínicos establecidos y la comparación de los efectos de las formulaciones utilizadas en este estudio, con respecto al control positivo de actividad antiviral (Aciclovir al 2.5% p/v). Se logró observar que el ungüento de Rioloatriona presentó un comportamiento similar al Aciclovir en la resolución de la queratoconjuntivitis herpética. Con estos resultados podemos deducir que la actividad anti-herpética *in vivo* de la formulación de Rioloatriona en ungüento es semejante a la actividad anti-herpética del Aciclovir a la concentración utilizada en estos ensayos. Es importante resaltar que no se observó el mismo comportamiento en los ensayos *in vitro* realizados por Silva-Mares y cols. (21) en los cuales la actividad anti-herpética del Aciclovir resultó mayor que la de la

Riolozatriona. Es evidente que no se puede hacer una comparación de los resultados obtenidos en ambos ensayos, debido a que las células infectadas en el ensayo *in vitro* presentarán diferente comportamiento que un organismo completo, ante los compuestos o fármacos probados.

Con respecto a la solución de Riolozatriona, ésta no presentó actividad anti-herpética y su comportamiento no fue similar al del Aciclovir.

Con los datos obtenidos se llevó a cabo el análisis estadístico mediante un análisis ANOVA de un factor, seguido de una comparación múltiple de Tukey, por ser comúnmente aplicado para el análisis estadístico de resultados en experimentos en modelos animales. Con el análisis ANOVA se obtuvo un valor de  $p < 0.0001$  (Tabla XVII) lo cual indicó que existen diferencias significativas entre los grupos, y para saber entre que grupos existía dicha diferencia, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey (figura 31).

Se obtuvieron diferencias significativas con valores  $p < 0.05$  al realizar la comparación del control positivo de infección con el Aciclovir al 2.5% (p/v) ( $p = 0.0386$ ), con el blanco de solución ( $p = 0.0056$ ) y con el ungüento de Riolozatriona al 0.3% (p/p) ( $p = 0.0333$ ). En el caso del Aciclovir al 2.5% (p/v) se esperaba que presentara una diferencia significativa con respecto al control positivo de infección, ya que es el control positivo de actividad antiviral. Sin embargo, no se

esperaba era que el blanco de solución con HP $\beta$ CD mostrara actividad anti-herpética, como se puede ver en la figura 31.

Es interesante hacer notar que la solución blanco de ciclodextrina, mostró una actividad antiviral parecida al Aciclovir, mientras que la formulación en solución de ciclodextrina con Rioloatriona no mostró un efecto antiviral. Estos resultados muestran cierta incongruencia debido a que se esperaría que la formulación en solución de Rioloatriona, mostrara mayor actividad que la ciclodextrina sola.

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la actividad biológica de HP $\beta$ CD y se encontró un reporte donde realizaron pruebas clínicas del efecto de la HP $\beta$ CD contra herpes labial comparada con un placebo (53). Los autores de este trabajo concluyen que la HP $\beta$ CD no tiene actividad anti-herpética de acuerdo a los resultados que obtuvieron. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, en los que sí observamos actividad anti-herpética de la HP $\beta$ CD en el modelo de queratoconjuntivitis herpética, sería interesante realizar un estudio más a fondo para confirmar si la HP $\beta$ CD tiene un efecto antiviral.

En el caso del ungüento de Rioloatriona, éste presentó diferencia significativa con respecto al control positivo de infección, lo que demostró su actividad anti-herpética *in vivo*. De igual forma se observó en el ungüento de Rioloatriona un comportamiento semejante al Aciclovir (2.5% p/v), al no presentar una diferencia

significativa entre ellos. Estos resultados concuerdan con lo observado en las gráficas presentadas en las figuras 29 y 30.

Con base en estos resultados demostramos que la Rioloatriona, en su forma farmacéutica de ungüento oftálmico a una concentración de 0.3% (p/p), presenta actividad anti-herpética *in vivo* contra la infección viral activa causada por VHS-1, ya que demostró evitar la diseminación y severidad de infección viral herpética en el modelo murino empleado.

A la fecha no se conoce un fármaco que elimine al virus en su fase de latencia en los ganglios trigéminos, por lo que sería interesante evaluar si la Rioloatriona posee esta capacidad en la infección no activa, para esto se requiere diseñar distintos experimentos a los ya realizados en este trabajo, en modelos animales.

Es importante mencionar que los resultados de este trabajo establecen un panorama amplio en el estudio de la actividad anti-herpética *in vivo* de los productos naturales, ya que se pueden diseñar y desarrollar experimentos en diferentes tiempos de la infección tanto antisépticos como terapéuticos, además de poder discernir el o los posibles mecanismos de acción antiviral de Rioloatriona *in vitro* como *in vivo*, con estos datos podemos ampliar el uso de Rioloatriona a otras infecciones virales.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- Se desarrollaron dos formulaciones de Rioloatriona en solución y en ungüento oftálmico, a concentraciones de 0.2% (p/v) y 0.3% (p/p) respectivamente.
- Se realizó la caracterización fisicoquímica de las 2 formulaciones desarrolladas.
- La formulación que presentó mejores características fue el ungüento oftálmico, sin embargo, se eligió probar ambas formulaciones en el modelo *in vivo* debido a que la solución oftálmica logró cumplir con el 80% de las características requeridas.
- Ambas formulaciones presentan estabilidad durante al menos 3 meses tanto en condiciones de temperatura ambiente como en condiciones de estabilidad acelerada.
- El ungüento de Rioloatriona desarrollado, presentó actividad anti-herpética *in vivo* de acuerdo a los resultados observados.

## **CAPÍTULO 6**

### **PERSPECTIVAS**

- Diseñar y realizar un experimento *in vivo*, en etapas tempranas de la infección viral, para evaluar la inhibición de la diseminación viral como respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de Rioloatriona.
- Realizar estudios de permeación en córnea de las formulaciones desarrolladas para estudiar su comportamiento en el ojo.
- Desarrollar nuevas formulaciones de Rioloatriona para su aplicación en piel y probarlas en modelos *in vivo* de herpes cutáneo: formulaciones con nanopartículas poliméricas, geles y cremas.
- Realizar pruebas de formulaciones en modelos *in vivo* de infección con VHS-2.
- Determinar el mecanismo de acción de la Rioloatriona.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Collier, L. & Oxford, J.. (2008). *Virología Humana*. México, D. F. : McGraw-Hill Interamericana Editores.
2. Fenner, F. & White, D. O.. (1973). *Virología Médica*. México, D. F. : La Prensa Médica Mexicana
3. Ryan, K. J. & Ray C. G. (2011). *Sherris. Microbiología Médica*. México, D. F. : McGraw-Hill Interamericana Editores.
4. Corey, L., & Wald, A. (2009). Maternal and Neonatal HSV Infections." The New England Journal of Medicine, **361**(14), 1376–1385
5. Looker, K. J., et al. (2015). "Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012." PLoS One **10**(10): e0140765.
6. Koneman, E. W. & Allen, S.. (2013). *Koneman. Diagnóstico microbiológico. texto y Atlas en color*. . México, D. F. : McGraw-Hill Interamericana Editores
7. Hussin, A., et. al. (2013). "Phenotypic and genotypic characterization of induced acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus type 1." Antiviral Research **100**(2):306–313
8. Lipipun, V., et al. (2003). "Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection *in vitro* and *in vivo*." Antiviral Res **60**(3): 175-180.
9. Munding, T. A. & Efferth, T. (2008). "Herpes simplex virus: Drug resistance and new treatment options using natural products." Molecular Medicine Reports **1**: 611-616
10. Amoros, M., et al. (1992). "Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis." J Nat Prod **55**(12): 1732-1740.
11. Armaka, M., et al. (1999). "Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1." Antiviral Res **43**(2): 79-92.

12. Bourne, K. Z., et al. (1999). "Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simplex virus type 2." Antiviral Res **42**(3): 219-226.
13. Dimitrova, Z., et al. (1993). "Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts." Acta Microbiol Bulg **29**: 65-72.
14. Kurokawa, M., et al. (1999). "Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* *in vitro* and *in vivo*." J Pharmacol Exp Ther **289**(1): 72-78.
15. Nawawi, A., et al. (2001). "*In vivo* antiviral activity of *Stephania cepharantha* against herpes simplex virus type-1." Phytother Res **15**(6): 497-500.
16. Bourne, N., et al. (1999). "Civamide (cis-capsaicin) for treatment of primary or recurrent experimental genital herpes." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2685-2688.
17. Pifarre, M. P., et al. (2002). "Therapeutic action of meliacine, a plant-derived antiviral, on HSV-induced ocular disease in mice." Exp Eye Res **75**(3): 327-334.
18. Tolo, F. M., et al. (2006). "Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus." J Ethnopharmacol **104**(1-2): 92-99.
19. Adame, J. & Adame, H.. (2000). *Plantas curativas del Noreste de México*. Monterrey, N. L.: Ediciones Castillo
20. Silva-Belmares, Y., et. al. (2014). "Antimicrobial and citotoxic activities from *Jatropha dioica* roots." Pak J Biol Sci **17**(5): 748-750.
21. Silva-Mares, D., et al. (2013). "Plants from northeast Mexico with anti-HSV activity." Nat Prod Commun **8**(3): 297-298.
22. Domínguez, X. A., et. al. (1980). "Rioloatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *sessiliflora*." Phytochemistry **19**: 2478
23. Silva-Mares, D., et. al. (2014). "Estudio de la actividad anti-herpética de *Jatropha dioica*." Química Hoy Chemistry Science **4**(A): 10-11
24. Pérez, E., et. al. (2009). "Formulación de soluciones oftálmicas de ciclosporina en colirio al 2 por 100 para la práctica clínica." An R Acad Nac Farm **75**(4): 911-922
25. Lallemand, F., et al. (2003). "Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge." Eur J Pharm Biopharm **56**(3): 307-318.



26. BenEzra, D., et. al. (1990). "Ocular penetration of Cyclosporine A." Br. J. Ophthalmol. **74**: 350-352.
27. Kanai, A., et. al. (1989). "The effect of the cornea of alpha cyclodextrin vehicle for cyclosporine eye drops." Transpl. Proc. **21**: 3150-3152.
28. Newton, C., et. al. (1988). "Topically applied cyclosporine in azone prolongs corneal allograft survival." Ophthalmol Vis Sci. **29**: 208-215.
29. Furrer, P., et. al. (1999). "Ocular tolerance of preservatives in the murine cornea." Eur J Pharm Biopharm. **47**: 105-112.
30. Tang-Liu, D., et. al. (1994). "Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs *in vitro*." J Pharm Sci **83**: 85-90.
31. Wade, A. & Weller, P. (1994). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London, UK. The Pharmaceutical Press.
32. Sall, K., et. al. (2000). "Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophtalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease." Ophtalmology. **107**(7): 1220.
33. Kaswan, R. L., et. al. (1988). "Intraocular penetration of topically applied cyclosporine." Transpl Proc. **20**: 650-655.
34. Milani, J. K., et. al. (1993). "Prolongation of corneal allograft survival with liposome-encapsulated cyclosporine in the rat eye." Ophtalmology. **100**: 890-896.
35. Law, S. L., et. al. (2000). "Aciclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption." J Controlled Rel. **63**: 135-140.
36. Calvo, P., et. al. (1994). "Study of the mechanism of interaction of poly(E-caprolactone) nanocapsules with the cornea by confocal laser scanning microscopy." Int J. Pharm. **103**: 283-291.
37. Zimmer, A., et. al. (1991). "Studies on the transport pathway of PBCA nanoparticles in ocular tissues." J Microencapsul. **8**: 497-504.
38. Felt, O., et. al. (1999). "Topical use of chitosan in ophtalmology: tolerance, assessment and evaluation oof precorneal retention." Int J Pharm. **180**: 185-193.
39. Pleyer, U., et. al. (1994). "Ocular absorption of cyclosporine A from liposomes incorporated into collagen shields." Curr Eye Res. **13**: 177-181.

40. Gebhardt, B. M., et. al. (1995). "Collagen as a delivery system for hydrophobic drugs: studies with cyclosporine." J. Ocul Pharmacol. Ther. **11**: 319-327.
41. Gebhardt, B. M., et. al. (1995). "Cyclosporine in collagen particles: corneal penetration and suppression of allograft rejection." J Ocul Pharmacol Ther. **11**: 509-517.
42. Valdés, S. M., et. al. (2009). "Los modelos en la evaluación preclínica de antivirales contra los virus del Herpes Simple." Rev Salud Anim. **31**(2): 86-92.
43. Alché, L., et. al. (2000). "Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice." J. Med. Virol. **61**: 474-480.
44. Morrison, L. A., Knipe, D. M. (1994). "Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection." J. Virol. **68**: 689-698.
45. Brandt, C. R., et. al. (1992). "A murine model of herpes simplex virus-induced ocular disease for antiviral drug testing". J. Virol. Methods. **36**(3): 209-222.
46. Jambhekar, S. S., Breen, P. (2016). "Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex". Drug Discovery Today. **21**(2): 356-362.
47. Jambhekar, S. S., Breen, P. (2016). "Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency". Drug Discovery Today. **21**(2): 363-368.
48. Gould, S., Scott, R. C. (2005). "2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): A toxicology review". Food and Chemical Toxicology. **43**: 1451-1459.
49. Bartlett, J. D., Jaanus, S. (2008). *Clinical Ocular Pharmacology*. Fifth edition. U.S.A: Butterworth-Heinemann. 17-37, 263-78.
50. Gennaro, A. R. (2003). *Remington: Farmacia*. 20<sup>a</sup> edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
51. Allen, L. V., Ansel, H. C. (2014). *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 10<sup>th</sup> edition. U.S.A: Wolters Kluwer Health.
52. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2011). 10<sup>a</sup> edición.

- 53.** Senti, G., et. al. (2013). "A Randomized, Double-Blind, Placebo- Controlled Study to Test the Efficacy of Topical 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin in the Prophylaxis of Recurrent Herpes Labialis". Dermatology. **226**:247-252.

## 8. ANEXOS

### Anexo A

#### Reporte de resultados Laboratorio de Bacteriología

**Institución:** Facultad de Medicina, UANL  
**Solicitante:** Q.C.B. Juan Francisco Tamez  
**Departamento:** Química analítica  
**Fecha de recepción:** 03 de Mayo 2017  
**Fecha de reporte:** 18 de Mayo 2017

#### Resultados

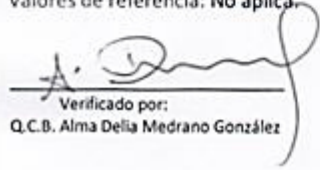
Se reciben para su estudio 8 frascos que contienen soluciones y ungüentos.


**Identificados como:** Solución blanco, Solución R1, Solución R2, Solución R3, Ungüento blanco, Ungüento R1, Ungüento R2, Ungüento R3.

Se procedió a inocular los medios correspondientes durante un periodo de 14 días, observándose los siguientes resultados:

Muestra	Agar Sangre	Agar Azida	Agar EMB	Agar soya Tripticasa	Agar Saboraud	Caldo tioglicolato
Solución blanco	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Solución R1	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Solución R2	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Solución R3	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Ungüento blanco	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Ungüento R1	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Ungüento R2	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
Ungüento R3	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.	Negativo.

Valores de referencia: No aplica.

  
Verificado por:  
Q.C.B. Alma Delia Medrano González

  
Dra. Gloria M. González González  
Responsable Sanitario  
Cédula Profesional 4124050

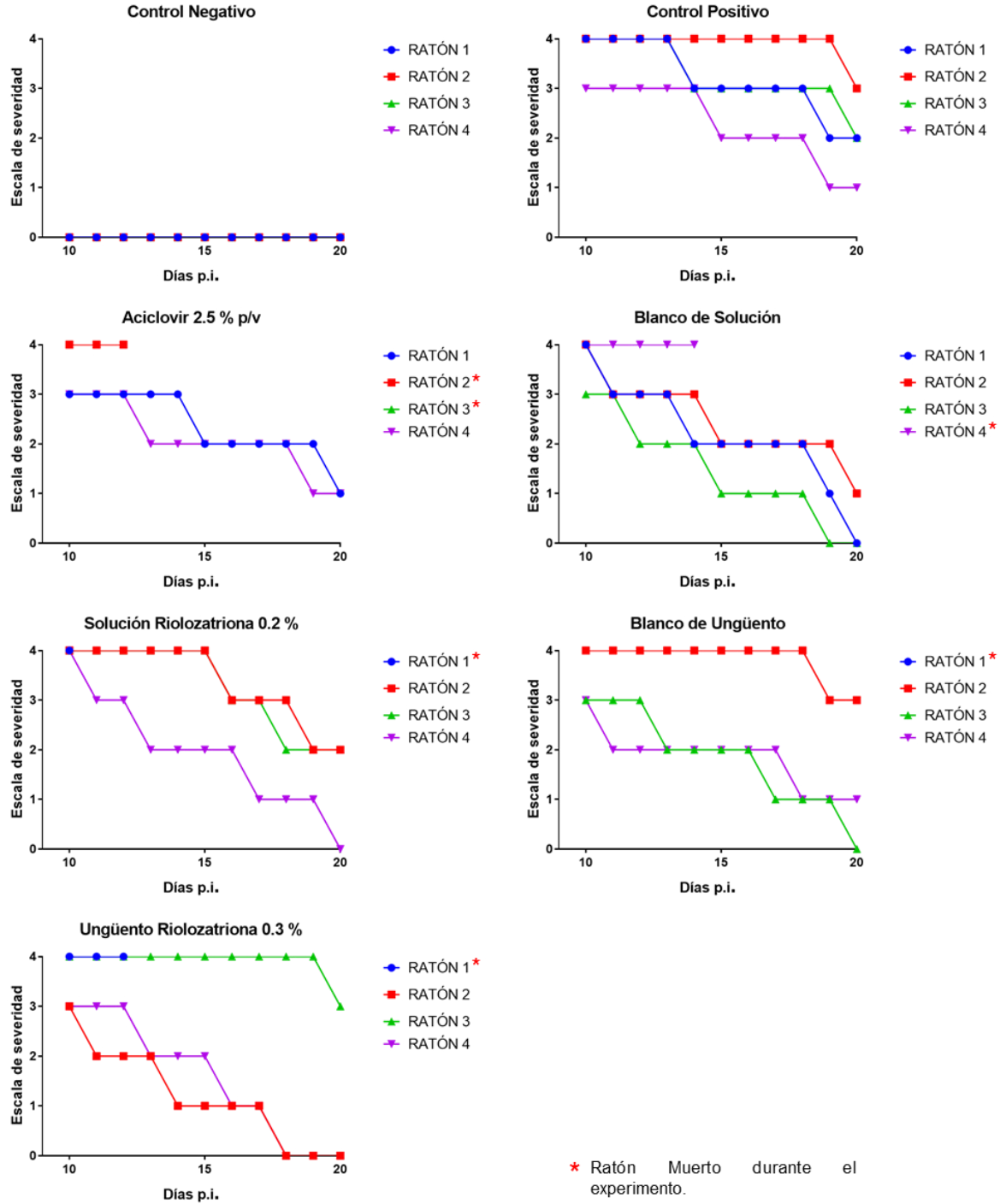
## Anexo B

**Tabla de resultados de las comparaciones mediante la prueba de Tukey.**

<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff,</b>	<b>95,00% CI of diff,</b>	<b>Significant ?</b>		<b>Adjusted P Value</b>
<b>Ctrl Negativo vs. Ctrl Positivo</b>	-3,159	-4,062 to -2,256	Yes	****	<0,0001
<b>Ctrl Negativo vs. Aciclovir 2.5%</b>	-2,227	-3,13 to -1,325	Yes	****	<0,0001
<b>Ctrl Negativo vs. Bco Solución</b>	-2,032	-2,935 to -1,129	Yes	****	<0,0001
<b>Ctrl Negativo vs. Solución Riolo</b>	-2,848	-3,751 to -1,945	Yes	****	<0,0001
<b>Ctrl Negativo vs. Bco Ungüento</b>	-2,485	-3,388 to -1,583	Yes	****	<0,0001
<b>Ctrl Negativo vs. Ungüento Riolo</b>	-2,211	-3,114 to -1,308	Yes	****	<0,0001
<b>Ctrl Positivo vs. Aciclovir 2.5%</b>	0,9318	0,0291 to 1,835	Yes	*	0,0386
<b>Ctrl Positivo vs. Bco Solución</b>	1,127	0,2245 to 2,03	Yes	**	0,0056
<b>Ctrl Positivo vs. Solución Riolo</b>	0,3109	-0,5918 to 1,214	No	ns	0,9413
<b>Ctrl Positivo vs. Bco Ungüento</b>	0,6736	-0,2291 to 1,576	No	ns	0,2755
<b>Ctrl Positivo vs. Ungüento Riolo</b>	0,9482	0,04546 to 1,851	Yes	*	0,0333
<b>Aciclovir 2.5% vs. Bco Solución</b>	0,1955	-0,7073 to 1,098	No	ns	0,9944
<b>Aciclovir 2.5% vs. Solución Riolo</b>	-0,6209	-1,524 to 0,2818	No	ns	0,3711
<b>Aciclovir 2.5% vs. Bco Ungüento</b>	-0,2582	-1,161 to 0,6445	No	ns	0,9761
<b>Aciclovir 2.5% vs. Ungüento Riolo</b>	0,01636	-0,8864 to 0,9191	No	ns	>0,9999
<b>Bco Solución vs. Solución Riolo</b>	-0,8164	-1,719 to 0,08636	No	ns	0,1023
<b>Bco Solución vs. Bco Ungüento</b>	-0,4536	-1,356 to 0,4491	No	ns	0,7287
<b>Bco Solución vs. Ungüento Riolo</b>	-0,1791	-1,082 to 0,7236	No	ns	0,9965
<b>Solución Riolo vs. Bco Ungüento</b>	0,3627	-0,54 to 1,265	No	ns	0,8841
<b>Solución Riolo vs. Ungüento Riolo</b>	0,6373	-0,2655 to 1,54	No	ns	0,3397
<b>Bco Ungüento vs. Ungüento Riolo</b>	0,2745	-0,6282 to 1,177	No	ns	0,9676

## Anexo C

### Gráficas de severidad de los cuatro ratones de cada grupo.



## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**Juan Francisco Tamez Fernández**

**Candidato para el grado de  
Maestría en Ciencias con Orientación en Química Biomédica**

**Título de Tesis:** DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN TÓPICA DE RIOLOZATRIONA Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD *in vivo* CONTRA VHS-1

**Área de estudio:** Química Analítica.

### **Biografía:**

#### **Datos personales:**

Nacido en Allende, Nuevo León el 20 de septiembre de 1993, hijo de Armando Tamez Tamez y Elizabeth Fernández Hurtado; hermano de Lilia Lizeth Tamez Fernández y Armando Tamez Fernández.

#### **Educación:**

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.

Grados obtenidos: Licenciatura de Químico Clínico Biólogo.

Reconocimientos por Trayectoria Sobresaliente al haber obtenido Mención Honorífica en la Carrera de Químico Clínico Biólogo y por haber obtenido el Nombramiento al Estudiante de Posgrado Distinguido en la Maestría en Ciencias con Orientación en Química Biomédica en el año 2016.

#### **Experiencia profesional:**

Servicio Social como Auxiliar en Investigación en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, UANL.

Prácticas Profesionales en el Hospital de Alta Especialidad CHRISTUS MUGUERZA, Monterrey, N. L.